

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
Direktor: Prof. Dr. med. dent. Hermann Lang



# **Interaktionen von dentalen Stammzellen mit parodontopathogenen Bakterien – Eine *in-vitro*-Studie**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Anne Biedermann  
aus Rostock

Rostock, 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. Hermann Lang

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Bernd Kreikemeyer

Institut f. Med. Mikrobiologie, Virulogie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: PD Dr. med. Roland Schulze-Röbbecke

Institut f. Med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Düsseldorf

4. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang

Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

Tag der Einreichung: 23.01.2015

Tag der Verteidigung: 13.07.2016

## **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

### **Originalarbeiten**

**Biedermann, A.;** Kriebel, K.; Kreikemeyer, B.; Lang, H. (2014):

Interactions of Anaerobic Bacteria with Dental Stem Cells: An *In Vitro* Study. *PLoS ONE* 9(11): e110616.

Kriebel, K.; **Biedermann, A.;** Kreikemeyer, B.; Lang, H. (2013):

Anaerobic Co-Culture of Mesenchymal Stem Cells and Anaerobic Pathogens - A New *In Vitro* Model System. *PLoS One* 8:e78226.

### **Posterpräsentationen und Vorträge**

**Biedermann, A.;** Standar, K.; Kreikemeyer, B.; Lang, H. (2011):

Interaction of oral bacteria with mesenchymal stem cells

Posterpräsentation, AFG Mainz

**Biedermann, A.;** Kriebel, K. (2011):

In vitro effects of oral bacteria on mesenchymal stem cells

Vortrag, IADR CED, Budapest

Kriebel, K.; **Biedermann, A.;** Kreikemeyer, B.; Lang, H. (2012):

Spezifische Interaktion oraler Mikroorganismen mit humanen Stromazellen

Abstract, AFG-Tagung, Mainz

Kriebel, K.; **Biedermann, A.;** Kreikemeyer, B.; Lang, H. (2012):

Untersuchung der immunmodulatorischen Funktion von Stammzellen

Poster, Dt. Zahnärztetag, Frankfurt/Main

## **Inhalt**

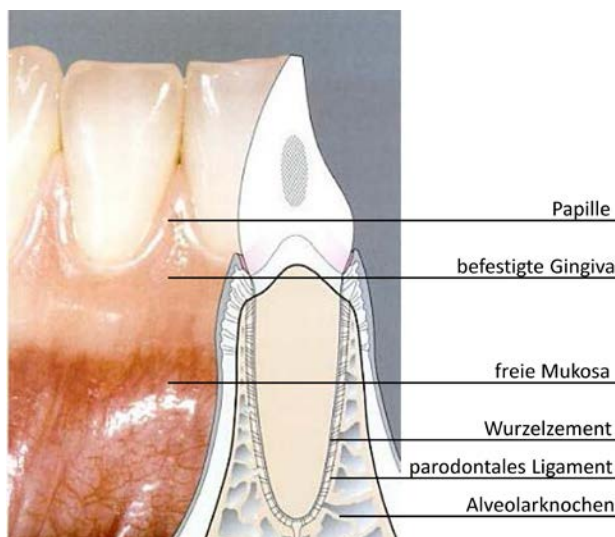
|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Einleitung .....   | 1  |
| 1.1   | Parodontitis .....   | 2  |
| 1.2   | Stammzellen .....  | 5  |
| 1.2.1 | Mesenchymale Knochenmarksstammzellen .....                     | 6  |
| 1.2.2 | Dentale Stammzellen.....                                       | 6  |
| 1.3   | Differenzierte Zellen.....                                     | 7  |
| 1.4   | Orale pathogene Bakterien .....                                | 8  |
| 1.4.1 | F. nucleatum .....   | 8  |
| 1.4.2 | P. gingivalis .....  | 9  |
| 1.5   | Wechselwirkungen zwischen Bakterien und humanen Zellen .....   | 9  |
| 1.6   | Stammzellgestützte Geweberegeneration.....                     | 12 |
| 1.7   | Zielstellung und Hypothese .....                               | 12 |
| 2     | Material und Methoden .....                                    | 14 |
| 2.1   | Eukaryonte Zellen.....   | 14 |
| 2.1.1 | Zellisolation.....   | 14 |
| 2.1.2 | Kultivierungsbedingungen der Zellen .....                      | 15 |
| 2.1.3 | Charakterisierung und Identifizierung der hDFSC .....          | 16 |
| 2.2   | Bakterienstämme .....  | 17 |
| 2.2.1 | Kultivierungsbedingungen der Bakterienspezies .....            | 18 |
| 2.3   | Anaerobe Ko-Kultur .....                                       | 19 |
| 2.3.1 | Wachstum der Bakterien in DMEM-Zellkulturmedium .....          | 19 |
| 2.3.2 | Überleben der humanen Zellen unter anaeroben Bedingungen ..... | 19 |
| 2.4   | Analyse der Bakterien-Zell-Wechselwirkungen .....              | 20 |
| 2.4.1 | Adhärenz- und Internalisierungsversuche .....                  | 20 |
| 2.4.2 | Zytokinantwort (IL-8-Sekretion).....                           | 22 |
| 2.5   | Chemikalien, Enzyme, Antibiotika .....                         | 24 |
| 2.6   | Verbrauchsmaterialien.....                                     | 26 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 2.7   | Statistik .....   | 27  |
| 2.8   | Software .....  | 27  |
| 2.9   | Laborgeräteausstattung .....  | 28  |
| 3     | Ergebnisse .....  | 29  |
| 3.1   | Isolierung der hDFSC und Zellkultur .....                           | 29  |
| 3.2   | Identifizierung und Charakterisierung der hDFSC.....                | 29  |
| 3.2.1 | FACS-Analyse und Differenzierung .....                              | 29  |
| 3.3   | Bakterien-Zell-Wechselwirkungen in anaerober Ko-Kultur .....        | 31  |
| 3.3.1 | Wachstumsuntersuchung der Bakterien in Zellkulturmedium .....       | 31  |
| 3.3.2 | Überlebensrate der humanen Zellen unter anaeroben Bedingungen.....  | 31  |
| 3.4   | Adhärenz- und Internalisierung .....                                | 32  |
| 3.4.1 | Adhärenz und Internalisierungswerte .....                           | 33  |
| 3.4.2 | Morphologische Untersuchung der Adhärenz und Internalisierung ..... | 37  |
| 3.5   | Zytokinantwort (IL-8-Sekretion) .....                               | 42  |
| 4     | Diskussion .....  | 47  |
| 4.1   | Anaerobe Bakterien-Zell-Ko-Kultur .....                             | 48  |
| 4.2   | Vergleichende Analyse der Bakterien-Zell-Interaktionen.....         | 50  |
| 4.2.1 | Adhärenz- und Internalisierungsuntersuchung.....                    | 50  |
| 4.2.2 | Zytokinantwort (IL-8-Sekretion).....                                | 55  |
|       | Zusammenfassung .....   | 58  |
|       | Ausblick .....  | 61  |
|       | Literaturverzeichnis.....   | 63  |
|       | Anhang .....  | I   |
|       | Abbildungsverzeichnis .....   | III |
|       | Tabellenverzeichnis.....  | IV  |
|       | Abkürzungsverzeichnis .....   | V   |
|       | Selbständigkeitserklärung .....                                     | VII |

## 1 Einleitung

Trotz modernster Technik, intensiver Forschung und steter Weiterentwicklung in der (Zahn-) Medizin lässt die weit verbreitete Erkrankung des Zahnhalteapparates, die Parodontitis, immer noch viele Fragen offen. Seit den 1960er Jahren hat sich die Vorstellung von der allein Plaque-bedingten Entität hin zu einer multifaktoriellen entzündlichen Erkrankung mit individuellen Risikofaktoren und Prädispositionen gewandelt. Wegweisende Publikationen führten zu einem Paradigmenwechsel in der Vorstellung über die Parodontitis, wie die Entdeckung der initiiierenden Rolle von Plaque-Bakterien in der Gingivitis (Loe *et al.* 1965), histologische Untersuchungen des Entzündungsgeschehen des Zahnhalteapparates (Page und Schroeder 1976), die Anerkennung von individuellen Unterschieden bezüglich der Anfälligkeit für diese Erkrankung (Loe *et al.* 1986) und die Bedeutung der Wirts-Reaktion (Page *et al.* 1997).

Heute geht man davon aus, dass der wichtigste Faktor für die Ausbildung einer Parodontitis die Immunreaktion des Wirtes auf den subgingivalen Biofilm ist (Preshaw und Taylor 2011). Paradoxe Weise sind die Abwehrprozesse des Körpers die Hauptursache für die umfangreiche Gewebsschädigung und Manifestation der Erkrankung (Preshaw und Taylor 2011). Die einzigartige Komplexität des Parodonts, das heißt des Zusammenspiels unterschiedlicher Hart- und Weichgewebe, erschwert überdies das Verständnis der Parodontitis mit ihren mannigfaltigen Wirtszell-Bakterien-Interaktionen. Mit der Entdeckung von lokalen Progenitorzellen in den dentalen und parodontalen Geweben tauchten wiederum neue Aspekte der parodontalen Biologie auf, die in den letzten Jahren weltweit intensiv beforscht wurden.

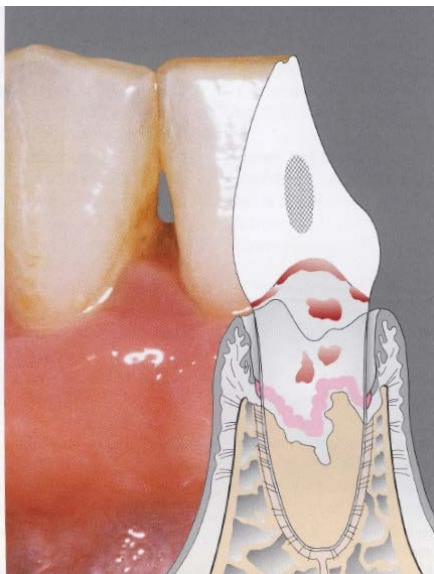


**Abb. 1.1. Anatomische Grundlagen des Parodonts**  
nach: Wolf *et al.* (2003)

## 1.1 Parodontitis

Parodontitis ist eine vielschichtige multifaktorielle Erkrankung. Das Zusammenwirken verschiedener Faktoren wie der Plaquemenge, der Änderung der Keimflora (hin zum Vorherrschen bestimmter parodontopathogener Keimkomplexe) und einer gestörten Wirtsabwehr führt zu der Ausbildung einer Parodontitis (Kinane und Attström 2005). Eine genetische Prädisposition und diverse veränderbare sowie unveränderbare Risikofaktoren tragen maßgeblich zur Entwicklung und Art der Ausprägung dieser Erkrankung bei (Kinane und Attström 2005). Beispielsweise das Rauchen, ein Diabetes mellitus oder auch genetisch determinierte Grunderkrankungen wie das Papillon-Lefèvre-Syndrom stellen Risikofaktoren dar, welche die Ausbildung, Progression und das klinische Bild einer Parodontitis entscheidend beeinflussen können (Page und Beck 1997).

Epidemiologische Untersuchungen belegten, dass die mittelschweren Formen der Parodontitis in Deutschland weit verbreitet sind. In einer Querschnittsanalyse zeigten in den untersuchten Patientengruppen 12,6 % der Jugendlichen, 52,7 % der Erwachsenen und 48,0 % der Senioren Zeichen einer moderaten Parodontitis. Die Prävalenz einer schweren Parodontalerkrankung wurde bei Jugendlichen in 0,8 %, bei Erwachsenen in 20,5 % und bei Senioren in 39,8 % der Fälle diagnostiziert (Micheelis *et al.* 2006). Der Fortschritt der Erkrankung bringt oft erhebliche Einbußen der oralen Lebensqualität mit sich (Merchant *et al.* 2005). Aus zahnärztlicher sowie (gesundheits-)ökonomischer Sicht und an erster Stelle für den betroffenen Patienten selbst stellt die oft lebenslange und umfangreiche Therapie eine nicht zu



**Abb. 1.2 Parodontitis**

aus: Wolf *et al.* (2003)

unterschätzende Herausforderung dar.

Die Parodontitis als Entität beschreibt einen entzündlichen Zustand des Zahnhalteapparates. Das makropathologische Erscheinungsbild ist geprägt von der Ausbildung parodontaler Taschen, resultierend aus dem entzündlichen Abbau der den Zahn umgebenden Gewebe. Der meist irreversible Attachmentverlust führt unbehandelt oft zu einer Funktionseinschränkung mit der Gefahr des Zahnverlustes. Mikropathologisch betrachtet, kommt es zu einer Kaskade entzündungsbedingter Prozesse, welche letztlich für die Gewebszerstörung verantwortlich sind. Durch bakterielle Antigene und

Toxine stimuliert, schütten die lokalen Zellen des angeborenen Immunsystems zunächst Zytokine und Chemokine aus, welche wiederum zu einer Rekrutierung weiterer, spezialisierter Abwehrzellen führen (Hausmann *et al.* 1970; Page 1991). Neben Virulenzfaktoren einiger Bakterien, wie dem LPS (Lipopolysaccharid) oder den Gingipainen von *P. gingivalis*, führen vor allem die vom Körper selbst sezernierten Zytokine, Eicosanoide und sekundären Entzündungsmediatoren wie Histamin, Matrixmetalloproteasen und reaktive Sauerstoffspezies schließlich zum irreversiblen Gewebeabbau (Offenbacher 1996).



**Abb. 1.3: Links** - Aggressive Parodontitis marginalis bei einer 40-jährigen Patientin mit deutlich erkennbarem Attachmentverlust. **Rechts** - Röntgenologische Darstellung des parodontitisbedingten Knochenabbaus an den oberen Inzisivi.

Nach dem „Critical Pathway Model“ von Offenbacher (1996) kommt es bei Unfähigkeit des Organismus, die mikrobielle Infektion einzudämmen oder zu beseitigen, zum entzündungsbedingten Gewebsverlust. Neben der Organisation in festhaftenden, sehr widerstandsfähigen Biofilmstrukturen ist die Fähigkeit einiger parodontopathogener Mikroorganismen zur Adhärenz und Invasion an bzw. in die Wirtszellen ein maßgeblicher Faktor, der zu einer eingeschränkten Effizienz der Abwehrzellen beiträgt. Die Adhärenz und die Internalisierung der Bakterien stellen somit einen weiteren Baustein für das Fortschreiten der parodontalen Entzündung dar. Zusätzlich zu der oralen Manifestation ist die Assoziation zwischen der Parodontitis und Allgemeinerkrankungen, wie beispielsweise einem erhöhten Risiko einer koronaren Herzerkrankung, der Vergesellschaftung mit rheumatischer Arthritis (Mercado *et al.* 2001) sowie dem Risiko von Frühgeburten, weitreichend beschrieben (DeStefano *et al.* 1993; Beck *et al.* 1998; Offenbacher 1996).

Im Vordergrund der therapeutischen Intervention steht, neben der Patientenschulung sowie der Motivation zur Umstellung und Intensivierung der Mundhygienemaßnahmen, die mechanische Entfernung harter und weicher Beläge von der Zahnoberfläche. Adjuvant kommen lokal wirksame antimikrobielle Spüllösungen und bei entsprechender



Indikationsstellung systemische oder lokale Antibiotika zum Einsatz. Diese Maßnahmen dienen der zusätzlichen Reduzierung der bakteriellen Keimlast vor allem im umliegenden Gewebe. Eines der Hauptziele der Parodontaltherapie liegt, nach der Beseitigung der Noxen, in der Regeneration der verlorengegangenen Strukturen. Zur Unterstützung der Geweberegeneration sind eine Reihe chirurgischer Verfahren entwickelt worden. Als Goldstandard gilt heute die Guided Tissue Regeneration (Karring et al. 1993), ein Verfahren, bei dem eine Membran über dem parodontalen Defekt eingesetzt wird, um eine schnelle Proliferation der Epithelzellen in den Defekt zu unterdrücken. Somit wird versucht, der Bildung eines langen Saumepithels vorzubeugen. Die zelluläre Repopularisierung mit (Stamm-)Zellen aus dem angrenzenden parodontalen Ligament soll auf diesem Wege ermöglicht werden. Zusätzlich können Knochendefekte mit speziellen Ersatzmaterialien aufgefüllt werden, um ein Grundgerüst für die Knochenneubildung zu bieten. Als ein optimales Therapieziel dieser Erkrankung wäre eine *restitutio ad integrum* mit der Ausbildung eines neuen Wurzelzementes, desmodontalen Faserapparates und neuen Knochens anzusehen. Dies wird jedoch mit allen heute gängigen Verfahren nur sehr unvorhersehbar mit oft unbefriedigendem Ergebnis erreicht (Estrela *et al.* 2011). Forschungsansätze liegen daher in der Untersuchung des biologischen/immunologischen Verhaltens von dentalen Stammzellen im gesunden oder erkrankten parodontalen Gewebe sowie einem möglicherweise zukünftigen therapeutischen Einsatz von Progenitoren zur zellgestützten gesteuerten parodontalen Geweberegeneration (Bartold *et al.* 2006).

## 1.2 Stammzellen

Im menschlichen Organismus sind etwa 200 verschiedene Zellarten zu unterscheiden. Der gemeinsame Ursprung aller Zellen ist jedoch die Zygote. Aus den undifferenzierten Progenitoren werden während der Embryonalentwicklung zunehmend spezialisierte Zellen. Das Endprodukt dieser Entwicklung stellen terminal differenzierte und höchst spezialisierte Zellen des adulten Körpers dar. Je nach Differenzierungspotential und Herkunft aus einem der drei Keimblätter unterscheidet man zwischen ektodermalen, entodermalen oder mesodermalen sowie den germinalen Stammzellen.

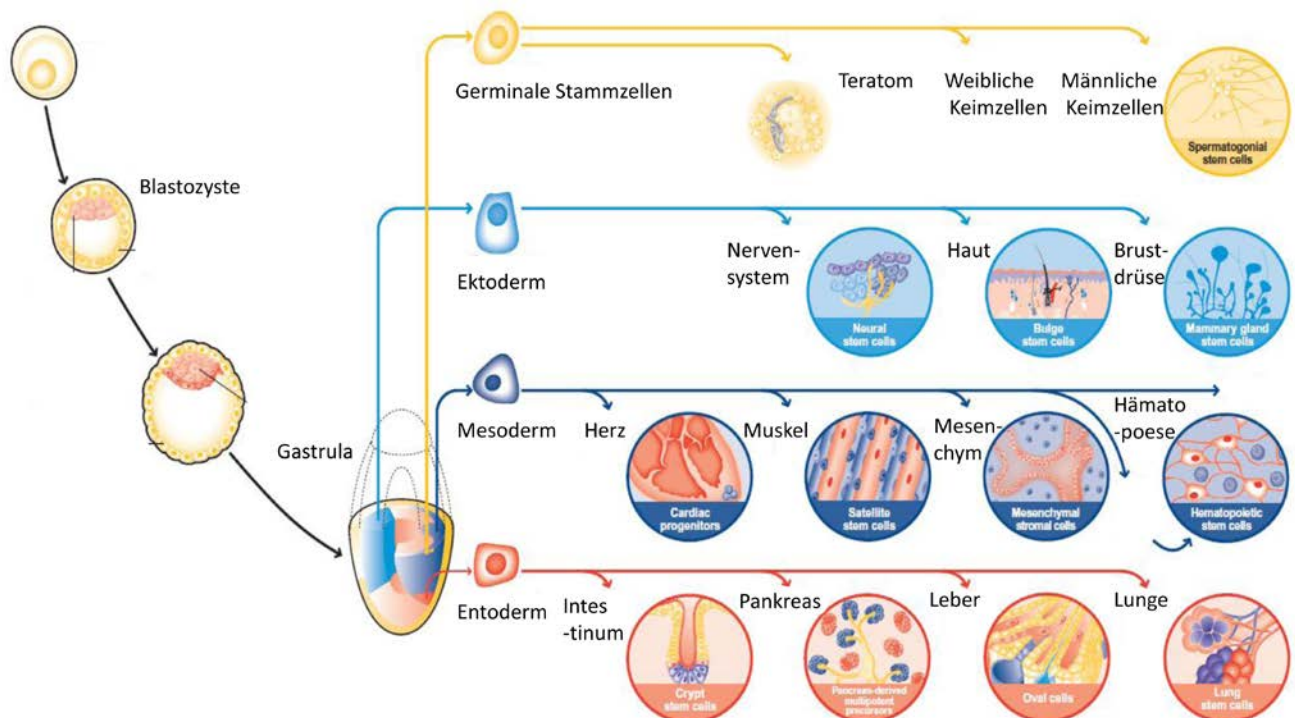


Abb. 1.4. Stammbaum der Zellen: nach Abcam plc, Cambridge, UK

Stammzellen haben die einzigartige Fähigkeit zur Selbsterneuerung und sind nicht terminal differenziert. Ihre Tochterzellen sind entweder selbst Stammzellen oder differenzierter als die Zelle, aus der sie hervorgegangen sind. Dies hängt davon ab, ob sich die Stammzelle symmetrisch oder asymmetrisch teilt. Die Signale, welche sie aus der jeweiligen Mikroumgebung ihrer Nische erhält und die dazu führen, dass sie entweder einen Selbsterneuerungs- oder einen Differenzierungszyklus startet, wurden in Modellsystemen erforscht (Blanpain *et al.* 2004; Yamashita *et al.* 2003; Neuß-Stein 2004).

### **1.2.1 Mesenchymale Knochenmarksstammzellen**

Erstmals wurden mesenchymale Stammzellen 1968 von Friedenstein und Mitarbeitern beschrieben (Friedenstein *et al.* 1968). Sie nannten die aus dem Knochenmark isolierten, spindelförmigen, klonogenen Zellen „colony-forming unit fibroblasts“. Erst später wurden sie aufgrund ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung von Caplan (1991) als mesenchymale Stammzellen (MSC) bezeichnet. Von den ebenfalls im Knochenmark befindlichen hämatopoetischen Stammzellen unterscheiden sich MSC durch die Charakteristika der Plastikadhärenz sowie der fehlenden hämatopoetischen Oberflächenmarker CD14, CD34 und CD45. Ein weiteres Kriterium zur Definition der MSC nach der International Society for Cellular Therapy ist ihre *in-vitro*-Differenzierbarkeit in Osteoblasten, Adipozyten sowie Chondrozyten (Dominici *et al.* 2006). Ihre Aufgabe liegt vornehmlich in der Unterstützung und Regulierung der Gewebshomöostase sowie der Regeneration nach infektiös oder traumatisch bedingten Gewebsverlusten (Minguell 2001; Phinney und Prockop 2007).

Bezüglich der Erforschung von Stammzellen, vor allem als therapeutisches Mittel, hat es unlängst ein Umdenken gegeben. Ursprünglich ging man davon aus, dass der Einsatz von Stammzellen aufgrund ihrer multipotenten Differenzierbarkeit der ideale therapeutische Ansatz für die Geweberegeneration wäre (Prockop und Oh 2011). Aktuell liegt der Forschungsschwerpunkt eher in der Untersuchung ihrer speziellen immunmodulatorischen Fähigkeiten. Neuste Studien zeigen, dass Stammzellen im Entzündungsgebiet Einfluss auf verletzte Zellen sowie vorhandene Abwehrzellen nehmen. Ihre Aufgabe liegt in der Limitierung der entzündlich bedingten Gewebsdestruktion und der Unterstützung von Heilungs- und Reparations- sowie Regenerationsprozessen (Prockop und Oh 2011; Auletta *et al.* 2012).

### **1.2.2 Dentale Stammzellen**

Neben dem Knochenmark konnten in den letzten Jahren die unterschiedlichsten Gewebearten als Quelle für Progenitoren mit Stammzeleigenschaften identifiziert werden. Aufgrund ihrer leichten Verfügbarkeit sind Stammzellen aus dentalem Gewebe nicht nur für die Zahnmedizin von großem wissenschaftlichen Interesse (Estrela *et al.* 2011).

Anhand ihres entwicklungsbiologischen Ursprunges lassen sich dentale Stammzellen in ektodermale und ektomesenchymale Vorläuferzellen einteilen, wobei die ektodermalen Stammzellen durch ihr Verschwinden während des Zahndurchbruches ihre Bedeutung für die

biologischen Prozesse im adulten Individuum verlieren (Radlanski 2011; Morsczeck *et al.* 2007). Die ektomesenchymalen Stammzellen hingegen bleiben zeitlebens im Gewebe bestehen. Hier lassen sich je nach Herkunft unterschiedliche dentale Stammzelltypen klassifizieren:

- Pulpa-Stammzellen (DPSCs) (Gronthos *et al.* 2000)
- Milchzahn-Stammzellen (SHEDs) (Miura *et al.* 2003)
- Parodontale Ligament-Stammzellen (PDLSCs) (Seo *et al.* 2004)
- Dentale Follikel-Stammzellen (HDFCs) (Morsczeck *et al.* 2005)
- Apikale Papilla-Stammzellen (SCAPs) (Sonoyama *et al.* 2008)

### **Dentale Follikel-Stammzellen (HDFSCs)**

Der dentale Follikel umgibt den Zahnkeim und enthält die Zellen, welche später den Alveolarknochen, das parodontale Ligament und das Wurzelzement bilden. Diese sogenannten dentalen Follikel-Stammzellen aus dem Zahnsäckchen zeigen stammzelltypische Merkmale wie Plastikadhärenz und Klonogenität. Sie können unter *in vitro* Bedingungen proliferieren. Dabei exprimieren sie die neuronalen Stammzellmarker Notch-1 und Nestin (Morsczeck *et al.* 2005). Weiterhin verfügen sie über ein multipotentes Differenzierungspotential und die stammzellcharakteristischen Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 (Haddouti *et al.* 2009). Dentale Follikel-Stammzellen eignen sich besonders gut für *in-vitro*-Untersuchungen, da ihre Isolation aus dem Zahnsäckchen von aus medizinischer Indikation entfernten Weisheitszähnen ohne ethische Bedenken möglich und auch praktisch gut durchführbar ist.

## **1.3 Differenzierte Zellen**

### **Primäre gingivale Fibroblasten**

Die Gingiva ist als Teil des Parodonts aus einer Vielzahl verschiedener Zellen zusammengesetzt. Den größten Anteil bilden dabei die Fibroblasten (Sugawara *et al.* 1998). Der Terminus Fibroblast bezeichnet die aktive Form des Fibrozyten. Fibroblasten sind an Auf- und Abbauprozessen von Kollagen und Matrix beteiligt. Daneben sind sie aber auch in der Lage, Pathogene im Gewebe zu erkennen und auf diese zu reagieren. Somit bilden sie einen Teil der angeborenen Immunabwehr (Tamai *et al.* 2002).

### **Permanente gingivale Epithelzellen**

Bei den Ca9-22-Zellen handelt es sich um eine epitheliale Gingivakarzinom-Zelllinie. Verschiedene Studien zu Interaktionen von Zellen mit oralen Mikroorganismen wurden mit Ca9-22 bereits durchgeführt (Saito *et al.* 2008; Saito *et al.* 2012; Shimada *et al.* 2008; Tamai *et al.* 2011).

## **1.4 Orale pathogene Bakterien**

Der menschliche Organismus ist Wirt für eine komplexe und artenreiche mikrobielle Lebensgemeinschaft, welche die Haut und Schleimhäute besiedelt. Diese natürliche Mikroflora ist ein integraler Bestandteil eines vielschichtigen Systems, das die Aktivität pathogener Mikroorganismen behindern kann (Casadevall und Pirofski 2000; Hooper und Gordon 2001). Bei optimaler Zusammensetzung können diese sogenannten Kommensalen sowohl die Adhärenz als auch die Invasion von pathogenen Bakterien an und in Epithelzellen und deren dortige Vermehrung unterbinden. Darüber hinaus liefern einige Bakterienarten essentielle Nährstoffe, tragen zur Regulierung der epithelialen Entwicklung sowie der Reifung und Aufrechterhaltung des Immunsystems bei (Boman *et al.* 2000; Dixon *et al.* 2004; Hooper *et al.* 2001; Mazmanian *et al.* 2005). In der Mundhöhle können mehr als 700 verschiedene Spezies und Subspezies in unterschiedlichsten Kolonisationsmustern gefunden werden (Aas *et al.* 2005). Bei den ersten Besiedlern der Zahnoberflächen handelt es sich vornehmlich um Streptokokken und Actinomyceten. Diese Arten bilden die Grundlage für die Kolonisierung mit weiteren Actinomyceten und verwandten Gram-positiven sowie Gram-negativen Bakterien, beispielsweise *Fusobakterium nucleatum* (*F. nucleatum*). Eine Reifung des Biofilmes ist durch das Hinzukommen Gram-negativer Anaerobier wie *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) gekennzeichnet (Rosan und Lamont 2000; Kolenbrander *et al.* 2006). Unter den entsprechenden Voraussetzungen, wie einer geschwächten Wirtsabwehr, kann sich aus dieser opportunistischen Infektion eine (chronische) parodontale Erkrankung entwickeln.

### **1.4.1 *F. nucleatum***

Die Spezies *F. nucleatum* bezeichnet spindelförmige, Gram-negative, anaerobe Stäbchen (Bolstad *et al.* 1996). Sie gehören der Familie der Bacteroidaceae an und bilden eine Gattung mit 16 Spezies und sechs Subspezies. Weiterhin sind diese Bakterien saccharolytisch, nicht beweglich, Katalase-negativ und bilden keine Sporen aus. *F. nucleatum* ist eine der am häufigsten im Menschen anzutreffenden Spezies und als opportunistischer Erreger an der

Entstehung verschiedenster entzündlicher und nekrotisierender Prozesse beteiligt (Tan *et al.* 1996; Bolstad *et al.* 1996). Bei Kindern ebenso wie bei Erwachsenen ist *F. nucleatum* in der dentalen Plaque zu finden und steht in enger Verbindung zur Pathogenese von Gingivitiden sowie auch Parodontitiden (Könönen 2000; Moore und Moore 1994; Socransky und Haffajee 2002). Aufgrund seiner Fähigkeit zur Adhäsion an Wirtszellen (Babu *et al.* 1995; Darenfed *et al.* 1999; Mangan *et al.* 1989; Winkler *et al.* 1987) ebenso wie zur Ko-Aggregation mit anderen parodontopathogenen Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis* oder *Prevotella intermedia* (Brook und Walker 1986; Kinder und Holt 1993) wird *F. nucleatum* eine Rolle als Brücken-Spezies zugeschrieben. Somit soll es als Bindeglied zwischen frühen und späten Kolonisierern der dentalen Plaque fungieren (Socransky und Haffajee 2002). Bei den für *F. nucleatum* bekannten Virulenzfaktoren handelt es sich um Porine, Membranproteine und potente Lipopolysaccharide (Bolstad *et al.* 1996; Takada *et al.* 1988), aber auch toxische Metabolite wie z. B. Butyrat, Propionat oder Ammoniak sind von Bedeutung. Somit kommt *F. nucleatum* eine wichtige Rolle in der Destruktion der parodontalen Gewebe zu (Brook und Walker 1986; Feuille *et al.* 1994).

#### **1.4.2 *P. gingivalis***

Die Spezies der Gattung *P. gingivalis* sind obligat anaerobe, unbewegliche, asaccharolytische, Gram-negative, nicht sporenbildende kurze Stäbchen. Auf Blutagar kultiviert, bilden sich primär weißliche Kolonien, welche sich innerhalb von vier bis acht Tagen von außen nach innen dunkel färben. Ein typisches Charakteristikum dieser Gattung ist die umfangreiche Produktion von Enzymen, Proteinen und metabolischen Endprodukten, welche als Virulenzfaktoren vielseitig gegen die Wirtsabwehr agieren (Holt *et al.* 1999). Wichtige Hilfsmittel der Bakterien zum Überleben im Wirt sind Cystein-Proteinasen und Fimbrien, die das Anheften und Eindringen von *P. gingivalis* in die Wirtszelle ermöglichen (Amano 2003). Ein weiterer bedeutender Faktor ist das LPS in der Zellwand der Bakterien. LPS von *P. gingivalis* führt unter anderem zu einer CD14-unabhängigen Monozytenaktivierung und greift so aktiv in das Entzündungsgeschehen ein (Shapira *et al.* 1994).

### **1.5 Wechselwirkungen zwischen Bakterien und humanen Zellen**

An den Barriereflächen zwischen dem menschlichen Organismus und der Außenwelt kommt es fortwährend zum Kontakt von schützenden Zellschichten mit den unterschiedlichsten Kommensalen, aber auch pathogenen Bakterien. Ein maßgeblicher Schritt zur dauerhaften Besiedlung des Wirtes ist die Adhärenz der Keime an die Wirtszelle. Dabei kommt es in

einigen Fällen auch zu einer Internalisierung der Mikroorganismen. Für das Anheften haben spezialisierte Bakterien unterschiedlichste Mechanismen entwickelt, u. a. verschiedenartige Pili, Fimbrien und Adhäsine. Zur Abwehr der Mikroorganismen nehmen die Zellen über spezielle Rezeptoren, sogenannte pattern-recognition-receptors (PRRs), die pathogen-associated-molecular-patterns (PAMPs), also spezifische Pathogen-assoziierte Liganden, wahr. Zu den PRRs zählen funktionell drei unterschiedliche Klassen: sezernierende, endozytierende und signaltransferierende Rezeptoren (Medzhitov und Janeway Jr 2000). Für das Erkennen von Bakterien spielen vor allem die Toll-Like-Rezeptoren (TLR) eine Rolle. Ihre Bindung führt zur Aktivierung spezieller Signalkaskaden, welche in einer Zytokinexpression resultieren. Somit regt die betroffene Zelle eine Entzündungsreaktion an und aktiviert dadurch das angeborene sowie erworbene Immunsystem mit dem Ziel der aktiven Beseitigung der Pathogene.

Als äußere Schutzschicht müssen die Keratinozyten der Dermis anhaftende sowie eindringende Mikroorganismen wahrnehmen und auf diese gegebenenfalls reagieren. In den inneren Kompartimenten des Körpers obliegt diese Aufgabe den Schleimhäuten. Ein Großteil der mukosalen Zellen des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes steht permanent der Auseinandersetzung mit Bakterien gegenüber. *Escherichia coli* (*E. coli*) beispielsweise, einer der wichtigsten Erreger urogenitaler Infektionen, kann in die epithelialen Zellen eindringen, um sich dann in diesen zu replizieren (Mulvey 2002). Zur Bewerkstelligung der Adhärenz und Internalisierung an und in diese Zellen besitzt *E. coli* Adhäsionsorganellen wie Typ 1, P oder S Pili und Dr-Adhesine (Mulvey 2002).

Auch in der Mundhöhle findet man dieses Szenario wieder. Mit der Besiedlung subgingivaler Bereiche treten aus dem oralen Biofilmverband herausgelöste Bakterien mit den Zellen der parodontalen Gewebe in Kontakt. Diese Zellen dienen als Barriere und gleichzeitig als Sensor für die mikrobielle Infektion (Ismail und Hooper 2005). Es besitzen zwar viele der parodontalen Erreger die Fähigkeit zur Anheftung an Zellen, aber nur eine kleine Minderheit, wie *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis*, kann auch tatsächlich in diese eindringen (Han *et al.* 2000; Handfield *et al.* 2005; Lamont und Jenkinson 1998; Amornchat *et al.* 2003).

Die Zellen, die das Parodont von der Mundhöhle abgrenzen, sind epithelialen Ursprungs. Im darunter liegenden Bindegewebe findet man unter anderem Fibroblasten, Abwehrzellen wie Granulozyten und Makrophagen, aber auch Progenitorzellen (z. B. dentale und gingivale Stammzellen) (Zhang *et al.* 2009; Wolf und Rateitschak 2003; Estrela *et al.* 2011). Lokale

gewebsständige Stammzellen sind an regenerativen Prozessen und der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase beteiligt (Estrela *et al.* 2011). Das mögliche Aufeinandertreffen und die potenzielle Interaktion lokaler Stammzellen mit im Gewebe befindlichen Mikroorganismen sind daher sehr wahrscheinlich (Morsczeck *et al.* 2012). Bisherige Untersuchungen zu direkten Interaktionen von oralen Mikroorganismen mit humanen Zellen beschränkten sich fast ausnahmslos auf die Wechselwirkungen mit differenzierten Zelllinien. Hierbei wurden vor allem das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von Bakterien an bzw. in Wirtszellen sowie die daraus resultierende proinflammatorische Zytokinantwort der Zellen als kritische Schritte in der Pathogenese infektionsassoziierter Erkrankungen beleuchtet (Finlay und Cossart 1997; Meyer *et al.* 1997).

### **Zytokinantwort (IL-8-Sekretion)**

Die Stimulierung der zellulären Synthese von Zytokinen kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher bakterieller Bestandteile oder auch bakterieller Metabolite hervorgerufen werden. Bei Gram-positiven Spezies handelt es sich dabei beispielsweise um Protein A, Lipoteichonsäure oder Zellwandbestandteile wie Polysaccharide oder Pili. Bei Gram-negativen Bakterien haben vor allem LPS sowie Fimbrien und Peptidoglycane eine stimulierende Wirkung auf die Zytokinexpression und -synthese (Wilson *et al.* 1998). Über die Bindung spezifischer PAMPs an entsprechende TLRs wird via MAPK-Signaltransduktionswege (mitogen-activated protein kinase) unter anderem eine verstärkte IL-8-Produktion in den betroffenen Zellen hervorgerufen (Medzhitov und Janeway Jr 2000).

Interleukin-8 ist als Entzündungsmediator bei der chemotaktischen Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere neutrophiler Granulozyten, in das entzündete Gewebe involviert (Okada und Murakami 1998). So beruht die Akkumulation großer Mengen dieser Abwehrzellen in der Lamina propria und der Epithelzellschicht der entzündlichen Gingiva auf Extravasation der Zellen entlang eines IL-8-Konzentrationsgradienten (Okada und Murakami 1998). Es handelt sich bei Interleukin-8 um einen körpereigenen Transmitter aus der Gruppe der CXC-Motiv-Chemokine. Vorrangig wird es von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert. Des Weiteren ist IL-8 als Angiogenesefaktor an der Bildung und Neubildung von Blutgefäßen beteiligt (Koch *et al.* 1992).



## 1.6 Stammzellgestützte Geweberegeneration

Aufgrund der oft noch unbefriedigenden Ergebnisse herkömmlicher parodontologischer Therapieansätze wird aktuell umfangreich *in vitro* sowie in tierexperimentellen Studien der Einsatz stammzellbasierter regenerativer Verfahren untersucht. Dentale Stammzellen, vor allem hDFSC und hPDLSC, werden aufgrund ihrer Fähigkeit, kalzifiziertes und nicht kalzifizierte dentale Gewebe zu bilden oder deren Regeneration positiv zu beeinflussen, als potentielle therapeutische Mittel im Tissue Engineering bewertet (Estrela *et al.* 2011). An immunsupprimierten Mäusen konnten Seo *et al.* (2004) beobachten, dass *ex vivo* expandierte dentale Progenitoren aus dem Parodont in der Lage sind, mit Hilfe eines Carriers aus Hydroxylapatit/Trikalziumphosphat zement- und desmodontartige Strukturen zu bilden.

Lang *et al.* (1998) zeigten im porzinen Parodontitismodell, dass der Einsatz *ex vivo* expandierter Zellen des Alveolarknochens in der Guided Tissue Regeneration zu einem verbesserten Outcome bezüglich der Bildung von neuem Wurzelzement und Knochen führte. Bereits nach acht Tagen war die Bildung kalzifizierter Gewebe auf der Wurzeloberfläche nachweisbar.

Auch Liu (2008) beschrieb eine Stammzell-gestützte parodontale Regeneration im Schweinemodell. In dieser Untersuchung wurden bei 14 Minischweinen künstlich parodontale Defekte geschaffen. Anschließend brachten die Forscher autologe, *ex vivo* expandierte Stammzellen (PDLSC) aus dem parodontalen Ligament in die Defekte ein. Sie konnten anhand einer vorherigen durch retrovirale Vektoren vermittelten GFP-Markierung der Zellen (green fluorescent protein) nachweisen, dass diese tatsächlich in dem *de novo* gebildeten Knochen zu finden waren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne den Einsatz der PDLSC zur Unterstützung der Geweberegeneration war in der PDLSC-Gruppe ein deutlich erhöhter Knochenzuwachs sowie die Bildung eines parodontalen Ligamentes zu sehen.

Neben den zahlreichen Tiermodellen gibt es bereits eine klinische Fallstudie aus Japan, die an drei Patienten einen positiven Effekt des Einsatzes autologer dentaler Stammzellen aus dem Parodont zur Regeneration parodontaler Defekte dokumentieren konnte (Feng *et al.* 2010).

## 1.7 Zielstellung und Hypothese

Dentale Stammzellen sind leicht zugängliche, gut charakterisierte Zellpopulationen aus den Geweben des Zahnes bzw. seines Halteapparates. Aufgrund ihres Differenzierungspotentials und ihrer immunmodulatorischen Fähigkeiten stellen sie ein interessantes therapeutisches

Tool zur Unterstützung der Geweberegeneration dar. Es konnte gezeigt werden, dass dentale Stammzellen in der Lage sind, parodontale Gewebe und Knochen sowie zementartige kalzifizierte Partikel zu bilden (Lang *et al.* 1995; Morszeck *et al.* 2005). Aufgrund seines komplexen Aufbaus, bestehend aus Hart- sowie Weichgeweben, stellt das Parodont eine besondere Herausforderung an die Regeneration dar. Erschwerend kommt bei der parodontalen Regeneration hinzu, dass es sich um ein dauerhaft bakteriell belastetes Gewebe handelt. Besonders die der körpereigenen Abwehr unzugänglichen Anheftungspunkte an den Zahnhartsubstanzen und orale Schlupfwinkel erschweren eine Keimeliminierung. Dieser Umstand ermöglicht den Pathogenen eine einfache, dauerhafte und zahlreiche Besiedlung. Für die Zellen des Parodonts bedeutet dies, dass sie sich permanent mit mehr oder weniger pathogenen Mikroorganismen auseinandersetzen müssen. Vor allem für die Manifestation und Pathogenese parodontaler Erkrankungen, aber auch für mögliche regenerative Prozesse sind die dabei auftretenden Interaktionen von entscheidender Bedeutung (Andrian *et al.* 2006). Hinsichtlich des Einflusses von Bakterien auf lokale oder therapeutisch applizierte Stammzellen im Gewebe ist die Studienlage noch sehr lückenhaft. Somit sind Untersuchungen zu möglichen Bakterien-Zell-Interaktionen für das Verständnis der Biologie der Stammzellen sowie für deren potentiellen therapeutischen Einsatz relevant.

**Ziel dieser Arbeit** war es, Wechselwirkungen von dentalen Stammzellen mit parodontalen Erregern in direkter Ko-Kultivierung zu beleuchten und dabei Unterschiede zu drei weiteren Zelllinien in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades zu untersuchen.

Eine Grundvoraussetzung für die Arbeit mit obligat anaeroben Bakterien besteht in der strikten Einhaltung anaerober Kultur- und Arbeitsbedingungen. Viele der bisherigen Studien kultivieren zwar die Keime anaerob, führen aber die anschließenden Experimente unter aeroben Bedingungen durch. Dies hat zur Folge, dass die Bakterien zwar noch eine begrenzte Zeit überleben, aber ihre Vitalität kontinuierlich abnimmt und somit auch der Zeitraum der Versuchsdurchführung stark limitiert ist.

**Hypothese der Arbeit** ist, dass Stammzellen in Geweben mit permanenter bakterieller Belastung trotz des direkten Kontaktes mit pathogenen Mikroorganismen weiterhin funktionstüchtig bleiben und für regenerative Prozesse zur Verfügung stehen. Lokale dentale Stammzellen werden von einer bakteriellen Infektion weniger stark beeinflusst als vergleichsweise höher differenzierte Zellen mit anderen Aufgabenbereichen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Eukaryonte Zellen**

#### **Ethikvoten**

Die hBMSC wurden von Patienten, welche planmäßig einen chirurgischen Eingriff in der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universitätsmedizin Rostock (Schillingallee 35, 18057 Rostock, D) erhielten, gewonnen.

Die dentalen Follikelzellen stammen von zwei Patienten der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie (Strepelstraße 13, 18057 Rostock, D), bei welchen im Rahmen einer chirurgischen Weisheitszahnentfernung die noch nicht vollständig ausgereiften dritten Molaren inklusive des Zahnfollikels entfernt wurden.

Vor dem Eingriff erfolgte eine Aufklärung der Spender sowie die schriftliche Dokumentation des Einverständnisses auf einem Einwilligungs- und Aufklärungsbogen. Das experimentelle Protokoll und alle mit der intraoperativen Entnahme im Zusammenhang stehenden Schritte einschließlich der nachfolgenden Weiterverarbeitung der gewonnenen Zellen wurden durch das Ethikkomitee der Universität Rostock begutachtet und bewilligt (Ethikvoten: A 2011 119 und A 2011 91).

#### **2.1.1 Zellisolation**

##### **hDFSC**

Nach der Weisheitszahn-Osteotomie wurde das Zahnsäckchen mit Hilfe von Scaler und Pinzette von der Wurzel des Zahnes entfernt. Anschließend erfolgte eine mehrfache Spülung mit PBS versetzt mit 2–10 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, D) zur Reinigung von Blutresten und einer möglichen Kontamination während der Zahnentfernung. In einem nächsten Schritt wurden die Proben in DMEM F12-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, D) mit 2 % Penicillin/Streptomycin zur weiteren Aufbereitung unter Kühlung auf Eis in das Zellkulturlabor (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsklinikum Rostock, D) befördert. Es erfolgte eine mechanische Zerkleinerung der Gewebstücke mit Hilfe von Skalpell. Zur weiteren Auftrennung des gewonnenen Materials und Freisetzung der Zellen wurden die Proben mit Dispase II (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) versetzt (4mg/ml in serumfreiem DMEM-F12). Anschließend erfolgte eine enzymatische Aufspaltung des Gewebes im Inkubator (Binder, Tuttlingen, D) bei 37 °C und

5 % CO<sub>2</sub>. Nach 1–2 Stunden wurde die Enzym-Lösung mittels Zentrifugation bei 400 g und 4 °C für 4 min (Kühlzentrifuge Typ 5417 R, Eppendorf, Hamburg, D) entfernt. Der Überstand wurde verworfen. Im nächsten Schritt konnten die Zellen in Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) ausgesät werden. Als Kulturmedium wurde DMEM-F12 mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories, Marburg, D) verwendet. Erste Zellhaufen waren nach 5–6 Tagen sichtbar.

### **hBMSC**

Die Gewinnung der hBMSC erfolgte aus intraoperativ entnommenen Knochenmarksaspiraten aus dem Sternum. Die Zellen wurden durch Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universitätsmedizin Rostock für die Versuche bereitgestellt.

### **hGiF**

HGiF wurden von Frau Dr. G. Leyhausen/Prof. Dr. W. Geurtsen zur Verfügung gestellt (Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Medizinische Hochschule Hannover, D). Die Zellen entstammen Biopsien der Gingiva entfernter gesunder permanenter Prämolaren und Molaren.

### **Ca9-22**

Die Ca9-22-Zellen stammen aus der Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank Osaka, Japan.

## **2.1.2 Kultivierungsbedingungen der Zellen**

Als Kulturmedium wurde bei allen Zellen DMEM mit einem 10-prozentigen FKS-Zusatz sowie Penicillin/Streptomycin (2 %) verwendet. Die Inkubation erfolgte unter einer 5-prozentigen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre bei 37 °C in entsprechenden Zellkulturflaschen. Zusätzlich erhielten die hGiF Amphotericin B (2.5 mg/ml) (Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D).

### **Kryokonservierung**

Die Aufbewahrung der gewonnenen Zellen bis zur Verwendung in den entsprechenden Experimenten erfolgte mittels Kryokonservierung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe, D) überdeckt. Es folgte eine 5–10-minütige Inkubation bei 37 °C. Die abgelösten Zellen wurden mit DMSO-Einfriermedium (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) versetzt und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Die Aliquotierung erfolgte mit je 2 ml in Kryoröhrchen (Nunc, Roskilde, DK). Die befüllten Röhrchen wurden bei -80 °C in einer auf -20 °C vorgekühlten Kryobox (Nunc, Roskilde, DK) abgekühlt. Nach 24

Stunden bei -80 °C konnten die Röhrchen zur Aufbewahrung in Flüssigstickstoffbehälter überführt werden.

Das Auftauen der Proben erfolgte unmittelbar nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in einem 37 °C warmen Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO wurden die Zellen bei 300 g zentrifugiert und anschließend in der gewünschten Zellzahl in Zellkulturflaschen mit frischem DMEM, 10 % FKS und 2 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, D) ausgesät.

### **Passagieren**

Für die Passage der Zellen wurde das Medium mit einer Pipette (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) aus der Zellkulturflasche entnommen und die Zellen mit 2 ml Trypsin gewaschen. Anschließend erfolgte eine erneute Zugabe von 2 ml Trypsin und eine Inkubation für 5–10 min bei 37 °C. Mittels Lichtmikroskopie konnte regelmäßig der Fortschritt der Zellablösung überprüft werden. Nach Ablösung aller Zellen wurde die enzymatische Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 7 ml DMEM mit 10 % FKS gestoppt. Nachfolgend konnten die Zellen gezählt (Neubauerzählkammer – Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D) und mit der benötigten Zellzahl für Experimente oder weiteres Wachstum eingesät werden.

## **2.1.3 Charakterisierung und Identifizierung der hDFSC**

### **FACS-Analyse**

Mittels Durchflusszytometrischer-Analyse sollten die Stammzellen über den Nachweis spezifischer Oberflächenepitope identifiziert werden. Die Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und die Anzahl markierter Zellen pro Gesamtzellzahl detektiert. Zur Probe hinzugegebenes Propidiumiodid (Fluka Chemie AG, Buchs, CH) diente der Markierung toter Zellen. Für eine FACS-Analyse wurden ca.  $2,5 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von 100 µl in 1 % bovinem Serum Albumin (BSA) (Merck KGaA, Darmstadt, D) in PBS bei 4 °C für 30 Minuten vorinkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Anschließend wurde 1 µg/ml Primärantikörper zur Zellsuspension gegeben und für weitere 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff, in dem die Zellen dreimal in 100 µl 0,1 % BSA (in PBS) abzentrifugiert und resuspendiert wurden. Der letzte Resuspensionsschritt erfolgte in 1 % BSA (in PBS). Die Zellsuspension wurde anschließend für 45 Minuten bei 4 °C im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper (1:20-Verdünnung) inkubiert. Der vorher beschriebene Waschschriff wiederholte sich und die Zellen wurden in 100 µl PBS mit 1 µM Propidiumiodid resuspendiert. Als Negativkontrolle kam anstelle des Primärantikörpers ein speziesspezifisches Immunglobulin zum Einsatz. Die Messungen

erfolgten mit Hilfe des FACS scan flow cytometer (LSRII, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) und mit entsprechender CellQuest-Software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) konnten die Daten ausgewertet werden. Als Primärantikörper wurden monoklonale Antikörper aus der Maus gegen CD29, CD45, CD73, CD90 und CD105 verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein FITC-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper.

**Tabelle 2.1 Übersicht der Farbstoffe und Antikörper für FACS-Analyse**

| <b>Farbstoff</b>                      | <b>Hersteller</b>                |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| APC                                   | BD Biosciences, Heidelberg, D    |
| PerCP-Cy5,5                           | BD Biosciences, Heidelberg, D    |
| V500 (AmCyan)                         | BD Biosciences, Heidelberg, D    |
| PE                                    | BD Biosciences, Heidelberg, D    |
| Biotin/V450 Streptavidin Pacific Blue | BD Biosciences, Heidelberg, D    |
| Alexa Flour 488                       | Bio-Rad AbD Serotec, Puchheim, D |
| Near IR (APC-Cy7)                     | Invitrogen, Darmstadt, D         |

### **Differenzierung humaner Stammzellen**

Die Bestätigung des Stammzellcharakters der hDFSC und hBMSC erfolgte mittels Differenzierung der Zellen in Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten modifiziert nach Pittenger *et al.* (1999).

## **2.2 Bakterienstämme**

*P. gingivalis* W50 und W83 sowie *F. nucleatum* ATCC 23726 und ATCC 25586 wurden kommerziell erworben (Leibniz-Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, D; American Type Culture Collection, Manassas, USA).

**Tabelle 2.2: Übersicht verwendeter Bakterienstämme**

| <b>Stammbezeichnung</b>        | <b>Kurzcharakteristik</b>                            | <b>Hersteller/Referenz</b>                         |
|--------------------------------|--|--|
| <i>F. nucleatum</i> ATCC 23726 | obligat anaerob, Gram-negativ,<br>fusiforme Stäbchen | American Type Culture<br>Collection, Manassas, USA |
| <i>F. nucleatum</i> ATCC 25586 | obligat anaerob, Gram-negativ,<br>fusiforme Stäbchen | American Type Culture<br>Collection, Manassas, USA |
| <i>P. gingivalis</i> W50       | obligat anaerob, Gram-negativ,<br>kurze Stäbchen     | Leibniz-Institute DSMZ,<br>Braunschweig, D         |
| <i>P. gingivalis</i> W83       | obligat anaerob, Gram-negativ,<br>kurze Stäbchen     | Leibniz-Institute DSMZ,<br>Braunschweig, D         |

### 2.2.1 Kultivierungsbedingungen der Bakterienspezies

Zur Anzucht der Bakterien in Flüssigkulturen wurde PYG-Medium versetzt mit 5 µg/ml Hämin (Fluka Chemie AG, Buchs, CH) und 1 % Vitamin K (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, GB) verwendet. Als Festmedium diente Columbia-Blut-Agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D).

**Tabelle 2.3 Lösungen und Medium für die Bakterien-Kultur**

| <b>Lösung</b>      | <b>Zusammensetzung</b>   |
|--------------------|--|
| PYG-Medium         | Hefeextrakt 10 g, Pepton 5 g, Beef Extract 5 g,<br>Trypticase Pepton 5 g, Glucose 5 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 g,<br>Cystein 0,5 g, Salz-Lsg. 40 ml, Hämin-Lsg.<br>20 ml, Tween 1 ml, Vitamin-K-Lsg. 0,2 ml,<br>Aqua dest ad 1 l |
| Hämin-Stamm-Lösung | Hämin 50 mg, 1 N NaOH, ad 100 ml   |
| Salz-Lösung        | CaCl <sub>2</sub> 0,25 g, MgSO <sub>4</sub> 0,5 g, NaHCO <sub>3</sub> 10 g, NaCl<br>2 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g, Aqua dest ad 1 l  |
| Vitamin-K-Lösung   | Vitamin K 0,1 ml, 95 % Ethanol   |

Das PYG-Medium wurde zur Sterilisation bei 121 °C autoklaviert. Die hitzelabile Hämin-Lösung wurde durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (PVDF Membranfilter, Braun, Melsungen, D) nach dem Abkühlen des autoklavierten Mediums auf < 50 °C zugesetzt. Die Kultivierung der obligat anaeroben Bakterien erfolgte bei 37 °C unter strikt anaeroben Bedingungen (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>) in der Anaeroben-Werkbank (Withley MG500 anaerobic workstation, DWS Meintrupp, Lahden-Holte, D). Als Kulturgefäße dienten 50-ml-Falkonröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D).

### **Stammhaltung**

Zur längerfristigen Aufbewahrung der Bakterien wurde das Microbank™ System (Pro-LabDiagnostics, Neston, GB) nach Vorgaben des Herstellers genutzt. Die Lagerung der Stämme erfolgte bei -80 °C. Zur Rekultivierung wurden Columbia-Blut-Agar-Platten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) verwendet. Die Inkubation der beimpften Platten erfolgte bei 37 °C und unter anaeroben Bedingungen (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>).

## **2.3 Anaerobe Ko-Kultur**

Zur Etablierung einer anaeroben Bakterien-Zell-Ko-Kultur wurde das Bakterienwachstum in DMEM-Zellkulturmedium getestet, um dieses als gemeinsam nutzbares Medium für beide Spezies zu untersuchen. Die Bakterien wurden für die Wachstumsanalyse über 24 h anaerob in DMEM kultiviert.

### **2.3.1 Wachstum der Bakterien in DMEM-Zellkulturmedium**

In einer Vorkultur wurden die Bakterien in vorreduziertem PYG-Medium bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase angezogen, zentrifugiert (Heraeus Variofuge 3.0, 10 min, 4000 rpm, 4 °C) und die Bakteriensedimente mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde für jede Spezies in PBS die spezies-spezifische optische Dichte bei 600 nm (OD600) eingestellt. Diese entsprach bei allen Spezies etwa  $1 \times 10^8$  KBE/ml. Es erfolgte eine Verdünnung mit DMEM-Medium auf  $1 \times 10^7$  KBE/ml für den Startzeitpunkt der Messung. Die Kulturen wurden anschließend anaerob inkubiert und die optische Dichte im Spektrophotometer (SpectraMax M2, Molecular Devices, Ismaning, D) bei OD600 alle 10 Minuten gemessen. Aus den Werten konnte die Wachstumskinetik bestimmt werden.

### **2.3.2 Überleben der humanen Zellen unter anaeroben Bedingungen**

Für die Wachstumsversuche der Zellen unter anaeroben Bedingungen wurden diese mit  $3 \times 10^4$  Zellen/ml in unbeschichteten 24-Well-Zellkultur-Platten (Greiner Bio-One GmbH,



Frickenhausen, D) mit vorreduziertem DMEM-Medium inokuliert und für 1 bis 3 Tage unter anaeroben Bedingungen (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>) inkubiert. Nach jeweils 24, 48 und 72 h wurde das Medium verworfen und die Zellen mit Trypsin abgelöst. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurde der Anteil lebender Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusses (Deutsche Chemapol GmbH, Frankfurt, D) in einer Neubauerzählkammer (Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D) ermittelt.

## **2.4 Analyse der Bakterien-Zell-Wechselwirkungen**

### **2.4.1 Adhärenz- und Internalisierungsversuche**

Die Untersuchungen zur Adhärenz und Internalisierung wurden mit *P. gingivalis* W50 und W83 sowie *F. nucleatum* ATCC 23726 und ATCC 25586 durchgeführt. Getestet wurden alle vier in der Studie verwendeten Zelllinien: hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22. Die eukaryonten Zellen wurden als konfluenter Zellrasen in 24-Well-Zellkultur-Platten mit 1 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml (Ca9-22 oder hGiF) und 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml (hBMSC oder hDFSC) eingesät.

### **Quantifizierung mittels Lebendkeimzahlbestimmung**

Die Bakterienkulturen wurden nach Anzucht in entsprechendem Medium zentrifugiert, mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend in frischem DMEM-Medium ohne FKS resuspendiert. Nach Einstellung der optischen Dichte der Bakterien in DMEM auf etwa 1 x 10<sup>8</sup> KBE/ml (Ca9-22 und hGiF) sowie 1 x 10<sup>6</sup> KBE/ml (hBMSC und hDFSC) wurde die Bakteriensuspension zu den Zellen gegeben. Diese waren in 24-Well-Zellkultur-Platten über Nacht zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen. Es erfolgte eine anaerobe Inkubation der Platten für 2 Stunden sowie ein nachfolgendes Waschen der Wells mit 1x PBS (pH 7,4). Anschließend wurden pro Well 200 µl 0,05 % Trypsin/EDTA (Invitrogen, Darmstadt, D) zugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Nach Abnahme der Flüssigkeit mit den abgelösten Zellen konnten diese in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) überführt und für 5 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert werden (Kühlzentrifuge Typ 5417R, Eppendorf, Hamburg, D). Das Sediment wurde zur Zelllyse in Aqua dest. aufgenommen. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation erfolgte ein Durchmischen der Suspension sowie Ausplattieren auf Colombia-Blutagar-Platten (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D). Nach Anzucht der Bakterien über 4–7 Tage konnte mittels Lebendkeimzahlbestimmung die Summe der an die Zellen adhärennten Bakterien ermittelt werden.

Um selektiv die internalisierten Bakterien zu bestimmen, wurde nach der 2-stündigen Inkubation der Zellen mit den Keimen das DMEM-Medium verworfen und frisches mit 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 1 % Gentamycin (Invitrogen, Karlsruhe, D) versetztes DMEM-Medium zugesetzt. Es folgte eine anaerobe Inkubation der Kulturen für weitere 2 Stunden. Dabei wurden durch die selektiv extrazellulär wirkenden Antibiotika die anhaftenden Bakterien abgetötet. Die Quantifizierung internalisierter Keime erfolgte in der gleichen Weise wie zuvor für die adhärenenten Bakterien nach Freisetzung dieser durch Zelllyse, Aussaat, anschließende Anzucht und Lebendkeimzahlbestimmung.

### **Fluoreszenzmikroskopie**

Die Anzucht der Ko-Kulturen erfolgte in unbeschichteten 24-Well-Zellkultur-Platten unter anaeroben Bedingungen. Hierfür wurden die 24-Well-Platten mit runden, sterilen, unbeschichteten Plastik-Deckgläschen (Nunc, Wiesbaden, D) versehen, auf welche die humanen Zellen ausgesät und 24 h in DMEM-Medium bis zur vollständigen Konfluenz inkubiert wurden. Anschließend wurden die Bakterien nach Entfernung des Zellkultur-Mediums aus den Wells in einer MOI von 1:100 in 1 ml frischem DMEM dazugegeben. Die Analyse der Ko-Kulturen erfolgte nach 24, 48 und 72 h Inkubation. Hierzu wurde das Flüssigmedium entfernt und die Wells mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen. Zur Visualisierung der Ko-Kulturen erfolgte anschließend die Zugabe von einem Lebend/Tot-Farbstoff (Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit, Invitrogen, Darmstadt, D).

Für die Lebend/Tot-Färbung wurde die Farbstofflösung (Syto9/Propidiumiodid 1:1) 1:1000 in PBS verdünnt und auf die Ko-Kulturen gegeben. Nach einer 10–15-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss konnte die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation erfolgen. Die mikroskopischen Analysen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop BX60 (Olympus, Hamburg, D) unter Verwendung der Filter U-MWB (Ex 470-490, Em 520 nm), U-MWU (Ex 330-385 nm, Em 420 nm) und U-MWG (Ex 510-550 nm, Em 590 nm) (Olympus, Hamburg, D) durchgeführt. Die Bildaufnahmen erfolgten mit Hilfe der angeschlossenen Digitalkamera (Leica, Solms, D).

### ***Farbstoffe für die Fluoreszenzmikroskopie***

Das verwendete Kit umfasst zwei Farbkomponenten, Syto9 (Färbung lebender Bakterien und Zellen, grün fluoreszierend) und Propidiumiodid (Färbung toter Bakterien und Zellen, rot fluoreszierend). Die Färbung basiert auf dem Prinzip der Nucleinsäurebindung in den Zellen. Hierbei bindet sich das neutral geladene Syto9 an die DNS lebender, aber auch toter Zellen. Die zweite Farbstoffkomponente Propidium-Iodid kann aufgrund seiner positiven Ladung nur

beschädigte Zellmembranen passieren. In den toten Zellen verdrängt es Syto9 und lässt diese Zellen im Mikroskop rot fluoreszierend erscheinen.

### **Raster-Elektronenmikroskopie (REM)**

Die Ko-Kulturen wurden in unbeschichteten 24-Well-Zellkultur-Platten mit je einem runden, sterilen, unbeschichteten Kunststoff-Deckgläschen (Durchmesser 13 mm) pro Well inokuliert und für 1 bis 3 Tage unter anaeroben Bedingungen (80 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>) inkubiert. Nach Entfernung des Flüssigmediums erfolgte ein Waschen der Proben mit PBS, um diese anschließend für mindestens 24 h bei 4 °C in 1 ml 2,5 % Glutardialdehyd-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, D) zu fixieren. Die weitere Behandlung der Proben fand im Elektronenmikroskopischen Zentrum (EMZ, Universitätsmedizin Rostock) statt. Die Deckgläschen wurden 3 Mal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (Merck KGaA, Darmstadt, D) (pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Trocknung in einer Ethanolreihe mit aufsteigenden Konzentrationen (5 min 30 %, 5 min 50 %, 10 min 70 %, 15 min 90 %, 2 x 10 min 100 %). Nachfolgend wurden die Deckgläschen einer maschinellen „Kritischen-Punkt-Trocknung“ im Kritischer-Punkt-Trockner EMITECH K850 nach Herstellerangaben (Emitech, Lohmar, D) unterworfen. Es folgte eine 10-nm-Gold-Beschichtung der getrockneten Proben mit Hilfe eines Spezialbedampfungsgerätes (SputterCoater, Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D). Anschließend konnten die Ko-Kulturen mit dem Elektronenmikroskop DSM 960A (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) visualisiert und dokumentiert werden.

### **2.4.2 Zytokinantwort (IL-8-Sekretion)**

In der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Forschung sollte eine direkte immunologische Reaktion der humanen Zellen auf die Ko-Kultur mit parodontopathogenen Anaerobiern anhand der IL-8-Sekretion untersucht werden. Die Versuche wurden mit *P. gingivalis* W50 und W83 sowie *F. nucleatum* ATCC 23726 und ATCC 25586 durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte mit allen vier in der Studie verwendeten Zelllinien (hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22).

Nach Anzucht in PYG-Medium wurden die Bakterienkulturen zentrifugiert, mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend in frischem DMEM-Medium ohne FKS resuspendiert. Die Einstellung der optischen Dichte der Bakterien erfolgte in DMEM auf etwa 1 x 10<sup>8</sup> KBE/ml für die Ca9-22 oder hGiF und 1 x 10<sup>6</sup> KBE/ml für BMSC und DFSC. Anschließend wurden die entsprechenden Bakteriensuspensionen zu den Zellen gegeben, die in 24-Well-Zellkultur-

Platten über Nacht zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren. Die Platten wurden für 1, 2, 4 sowie 24 Stunden anaerob inkubiert und nachfolgend die Überstände mittels Pipette aus den Wells abgenommen. Nach Überführen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß erfolgte im nächsten Schritt das Zentrifugieren der Proben (Kühlzentrifuge Typ 5417R, 5 min, 8000 rpm, 4 °C). Der zell- und bakterienfreie Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß eingebracht. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C bis zur Durchführung der Versuche.

**Tabelle 2.4: Lösungen für den IL-8-ELISA-Test**

| <b>Lösung</b>       | <b>Zusammensetzung</b>  |
|---------------------|---|
| Enzym-Konzentrat    | konzentrierte Streptavidin-horseradish peroxidase<br>konjugiert mit BSA |
| ELISA-Verdünnung    | PBS mit 10 % FKS, pH 7,0  |
| Waschpuffer         | PBS mit 0.05 % Tween-20   |
| Stopplösung         | 1 M Phosphorsäure   |
| TMB-Substrat-Lösung | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in<br>Wasserstoffperoxid                 |

Zur quantitativen Bestimmung der Menge sezernierten IL-8s durch die Zellen wurde ein kommerziell erworbenes IL-8-ELISA-Kit (BD Bioscience, Heidelberg, D) verwendet.

Zuerst wurden 50 µL der ELISA-Verdünnung in jedes Well der mitgelieferten 96-Well-Mikrotiter-Platten gegeben. Die einzelnen Wells waren mit humanem monoklonalen Anti-IL-8-Antikörper beschichtet. Weiterhin erfolgte eine Zugabe von jeweils 100 µL des Standards (lyophilisiertes rekombinantes humanes IL-8) bzw. der Proben in die Wells, um dann für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Etwa 15 min vor dem Ende der Inkubationszeit wurden 12 µL des Detektions-Antikörpers (biotinierter humaner Anti-IL-8-Antikörper) mit 48 µL des Enzymkonzentrates (Streptavidin-horseradish peroxidase konjugiert mit BSA) gemischt. Als nächster Schritt wurde der Überstand verworfen und 5 Mal mit 300 µL des Waschpuffers (PBS mit 0.05% Tween-20) gespült. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Wells auf einer saugfähigen Papierunterlage (Tork, SCA Hygiene Products AFH Sales GmbH, Mannheim, D). In die getrockneten Wells wurde im nächsten Arbeitsschritt 100 µL Detektionsantikörper pro Well gegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend erfolgte das Verwerfen des Well-Inhaltes und ein 7-maliges Spülen mit dem Waschpuffer. Weiterhin wurden 100 µl TMB-Substrat-Lösung (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine in Wasserstoffperoxid) pro Well hinzugegeben und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von je 50 µl Stopp-Lösung (1 M Phosphorsäure). Abschließend konnte die Absorption bei 450 nm im Tecan Spectra Reader Classic (Tecan Trading AG, Männedorf, CH) gemessen werden.

## 2.5 Chemikalien, Enzyme, Antibiotika

**Tabelle 2.5: Übersicht verwendeter Chemikalien/Enzyme/Antibiotika**

| <b>Chemikalien/Enzyme/Antibiotika</b>          | <b>Hersteller</b>                       |
|--|---|
| 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)           | Invitrogen, Karlsruhe, D                |
| Agar (Agar technical No. 3)                    | Oxoid, Basingstoke, Hampshire, GB       |
| Amphotericin B                                 | Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D      |
| Bacto Proteose Peptone No. 5                   | BD Bioscience, Heidelberg, D            |
| Bacto Yeast Extract                            | BD Bioscience, Heidelberg, D            |
| BBL Trypticase Peptone                         | BD Bioscience, Heidelberg, D            |
| Beef Extract                                   | BD Bioscience, Heidelberg, D            |
| Bovines Serum Albumin (BSA)                    | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Colombia Agar                                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Cystein  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Dikaliumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O  | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                        | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| Dispase II                                     | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D |
| DMEM Glutamax                                  | Invitrogen, Karlsruhe, D                |
| DMEM F 12                                      | Invitrogen, Karlsruhe, D                |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)            | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Ethanol (absolut)                              | Zentralapotheke, Universität Rostock, D |
| Fetales Kälberserum (FKS)                      | PAA Laboratories, Marburg, D            |
| Gentamycin                                     | Invitrogen, Karlsruhe, D                |
| Glucose  | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Glutardialdehyd-Lösung (25 %)                  | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Glycerol (99 %)                                | Merck KGaA, Darmstadt, D                |
| Hämin  | Fluka Chemie AG, Buchs, CH              |
| Hefeextrakt                                    | Oxoid, Basingstoke, Hampshire, GB       |
| Humanes ELISA-KIT IL-8                         | BD Bioscience, Heidelberg, D            |

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| Kaliumacetat                                 | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Kaliumchlorid                                | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Kaliumdihydrogenphosphat                     | Serva, Heidelberg, D                 |
| Kaliumphosphat                               | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Live/Dead BacLight Viability Kit             | Invitrogen, Karlsruhe, D             |
| Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O        | Serva, Heidelberg, D                 |
| Natriumacetat                                | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Natriumchlorid                               | Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D   |
| Natriumdihydrogenphosphat x H <sub>2</sub> O | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Natriumhydroxid                              | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Natriumthiosulfat                            | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Penicillin/Streptomycin                      | Invitrogen, Karlsruhe, D             |
| Phosphorsäure                                | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Propidiumiodid                               | Fluka Chemie AG, Buchs, CH           |
| Salzsäure                                    | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Trinatriumcitrat-dihydrat                    | Merck KGaA, Darmstadt, D             |
| Trypanblau                                   | Deutsche Chemapol GmbH, Frankfurt, D |
| Trypsin                                      | Invitrogen, Karlsruhe, D             |
| Tween 20                                     | Serva, Heidelberg, D                 |
| Vitamin K                                    | Oxoid, Basingstoke, Hampshire, GB    |

## 2.6 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.6: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien**

| Verbrauchsmaterialien                       | Hersteller                               |
|---|--|
| Anaerocult®-Gefäße                          | Merck KGaA, Darmstadt, D                 |
| Anaer Indicator                             | bioMérieux, Nürtingen, D                 |
| Chamber-Slides LabTec Chambers              | Nunc, Wiesbaden, D                       |
| CryoTube™ Vials                             | Nunc™ A/S, Roskilde, DK                  |
| Deckgläschen (Plastik; 13 mm)               | Nunc, Wiesbaden, D                       |
| Desinfektionsmittel AHD2000                 | Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, D        |
| Desinfektionsmittel Bacillol®               | AF Bode Chemie, Hamburg, D               |
| Glasperlen (0,10–0,11 mm)                   | B. Braun Biotech, Melsungen, D           |
| Glasperlen (2,85–3,3 mm)                    | Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe, D       |
| Impfösen 731170, 731101                     | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |
| Küvetten (10 x 4 x 45 mm)                   | Sarstedt, Nümbrecht, D                   |
| Mikrobank™ System                           | Pro-Lab Diagnostics, Neston, GB          |
| Parafilm                                    | Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA |
| Petrischalen 82.1473 (92 x 16 mm)           | Sarstedt, Nümbrecht, D                   |
| Pipettenspitzen 10 µl                       | Starlab GmbH, Ahrensburg, D              |
| Pipettenspitzen Pipette Tips (200, 1000 µl) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |
| Plastikpipetten L27; 64; 08 (5, 10, 25 ml)  | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |
| Röhrchen Cellstar® Tubes (15, 50 ml)        | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |
| Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)            | Sarstedt, Nümbrecht, D                   |
| Stepper-Spitzen plus® (5; 10; 20 ml)        | Eppendorf, Hamburg, D                    |
| Sterifix® Injektionsfilter (0,2 µm)         | BB. Braun Melsungen AG, Melsungen, D     |
| Sterilfilter 430513, 430626 (0,22 µm)       | Corning incorporated, Kaiserslautern, D  |
| Spritzen BD Discardit™ II (2, 5, 20 ml)     | Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA    |
| Zellkulturflaschen                          | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |
| Zellkulturplatten, 96 und 24 Well           | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D   |

**Tabelle 2.7: Puffer**

| <b>Puffer</b> | <b>Zusammensetzung</b>   |
|---------------|--|
| PBS           | NaCl 1,37 M; KCl 0,027 M; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,015 M;<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,079 M.; Aqua dest. ad 1 l,<br>pH 7,4 |
| MOPS          | MOPS 0,1 M; Na-Acetat 0,04 M; EDTA 0,005<br>M, pH 7.0  |

Der Puffer wurde bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung einer 1x-PBS-Lösung wurde 10x PBS 1:10 in Aqua dest. verdünnt, der pH überprüft (pH 7,4) und der Puffer ebenfalls autoklaviert.

## 2.7 Statistik

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Versuche in mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten und jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Aus den Resultaten erfolgte die Bestimmung des Mittelwertes mitsamt Standardabweichung. Zur Auswertung wurde ein Tabellenkalkulationsprogramm sowie ein Programm zur Erstellung der Graphen (Microsoft Excel; GraphPad Prism 6) verwendet. In den Abbildungen konnten anschließend Mittelwert und Standardabweichungen graphisch aufgetragen werden. Aus diesen Werten ließ sich dann durch den T-Test ermitteln, ob die Unterschiede zwischen den hDFSC und den Vergleichszelllinien signifikant \* ( $p < 0,05$ ) oder hochsignifikant \*\* ( $p < 0,01$ ) waren.

## 2.8 Software

**Tabelle 2.8: Übersicht verwendeter Software**

| <b>Software</b>                     | <b>Hersteller</b>                                |
|-------------------------------------|--|
| MS Office (Word, Excel, PowerPoint) | Microsoft, Redmond, USA                          |
| Metavue                             | Molecular Devices, Downingtown, USA              |
| Prism 6 for Windows, Version 6.01   | GraphPad Software Inc., San Diego, USA           |
| Citavi, Version 3.4.0               | Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, CH      |
| SoftMax® Pro 5.4                    | MDS Analytical Technologies Inc., Sunnyvale, USA |
| CellQuest-Software                  | Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA            |



## 2.9 Laborgeräteausstattung

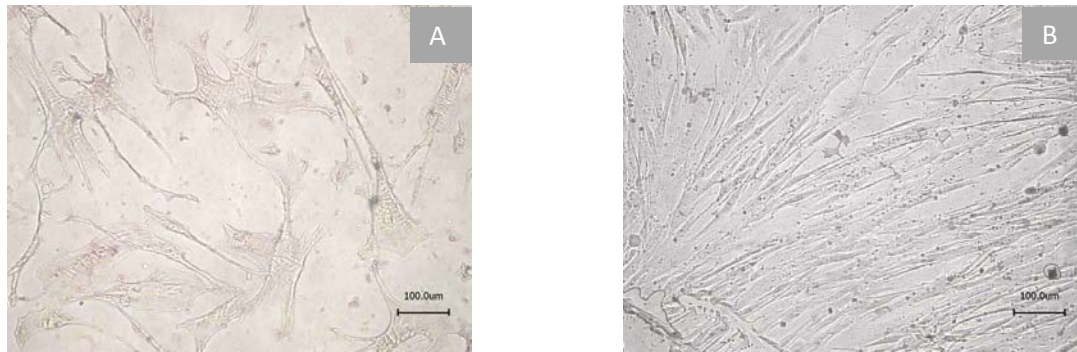
**Tabelle 2.9: Übersicht verwendeter Laborgeräte**

| <b>Laborgerät</b>                       | <b>Hersteller</b>                     |
|---|---------------------------------------|
| 96-well-Mikrotiterplatten               | Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA |
| Analysenwaage Typ BP 4100S              | Sartorius, Göttingen, D               |
| Biofuge pico                            | Heraeus, Hamburg, D                   |
| Biofuge fresco                          | Heraeus, Hamburg, D                   |
| Brutschrank Typ B6060                   | Heraeus, Hamburg D                    |
| Brutschrank, HeraCell                   | Heraeus, Hamburg, D                   |
| CO2-Inkubator Serie CB                  | Binder, Tuttlingen, D                 |
| Elektronenmikroskop DSM 960A            | Carl Zeiss AG, Oberkochen D           |
| Fluoreszenzmikroskop BX60               | Olympus, Hamburg, D                   |
| Gefrierschrank -80 C Typ                | Hera freeze Heraeus, Hamburg, D       |
| Heizblock Typ Thermostat 5320           | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| Inkubationsschüttler Typ 3031           | GFL, Wunstorf, D                      |
| Inkubationsschüttler Typ KTM 100RP      | HLC, Bovenden, D                      |
| Kritischer-Punkt-Trockner               | Emitech, Lohmar, D                    |
| Kühlzentrifuge Typ 5417 R               | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| miniMACS Anaerobic Workstation          | DWS Meintrupp, Lahden-Holte, D        |
| pH-Meter MP220                          | Denver Instrument GmbH, Göttingen, D  |
| pH-Meter inoLabR pH720                  | WTW GmbH, Weilheim, D                 |
| pH-Meter Typ MP 220                     | Mettler-Toledo, Greifensee, CH        |
| Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 l)     | Eppendorf, Hamburg, D                 |
| Pipettierhilfe Integra                  | Biosciences, Fernwald, D              |
| Spektrophotometer SpectraMax M2         | Molecular Devices, Ismaning, D        |
| Spezialbedampfungsgerät (SputterCoater) | Leica Mikrosysteme, Wetzlar, D        |
| Sterilbank Typ antair                   | BSK Telstar, USA                      |
| Sterilbank Arone Typ FC-640             | Safelab Systems LTD, GB               |
| Tecan Spectra Reader Classic            | Tecan Trading AG, Männedorf, CH       |
| Vortex-Genie Touch Mixer                | Scientific Industries, Bohemia, USA   |
| Withley MG500 Anaerobic Workstation     | DWS Meintrupp, Lahden-Holte, D        |
| Zentrifuge Varifuge 3.OR                | Heraeus, Hamburg, D                   |
| Zentrifuge Megafuge 4.0                 | Heraeus, Hamburg, D                   |
| Zentrifuge Megafuge 4.1                 | Heraeus, Hamburg, D                   |

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung der hDFSC und Zellkultur

Nach Aussaat der Gewebestückchen waren nach 7–8 Tagen lichtmikroskopisch erste Zellen sichtbar. Es erfolgten ein regelmäßiger Mediumswechsel und anschließendes Passagieren. Die Zellen proliferierten und bildeten nach etwa 3 Wochen einen konfluenten Zellrasen.



**Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme** A) hDFSC 7 Tage nach Aussaat. B) hDFSC-Kultur nach 21 Tagen. Das Erscheinungsbild der frisch isolierten hDFSC war in allen Kulturen ähnlich. Es waren vorrangig große spindelförmige Zellen zu sehen. Im Rahmen der Passagierung wurden die Zellen homogen ausgesät und bildeten einen einheitlichen Zellrasen.

#### 3.2 Identifizierung und Charakterisierung der hDFSC

##### 3.2.1 FACS-Analyse und Differenzierung

Die Identifizierung und Charakterisierung der DFSC wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse ausgewählter Stammzellmarker sowie multilinearer Differenzierung realisiert. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Markers für mesenchymale Stammzellen wurde das Vorhandensein der für Stammzellen typischen Oberflächenantigene CD29, CD44, CD73 und CD90 untersucht. Zudem wurde zur Abgrenzung von hämatopoetischen Stammzellen der Marker CD45 getestet. Abbildung 3.2 zeigt ausgewählte Histogramme der FACS-Analyse. Die Expression des hämatopoetischen Markers CD45 konnte als negativ bestimmt werden, alle stammzelltypischen Marker wurden nachgewiesen. Zum Nachweis der Multipotenz der isolierten Stammzellen erfolgte eine Differenzierung zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten.

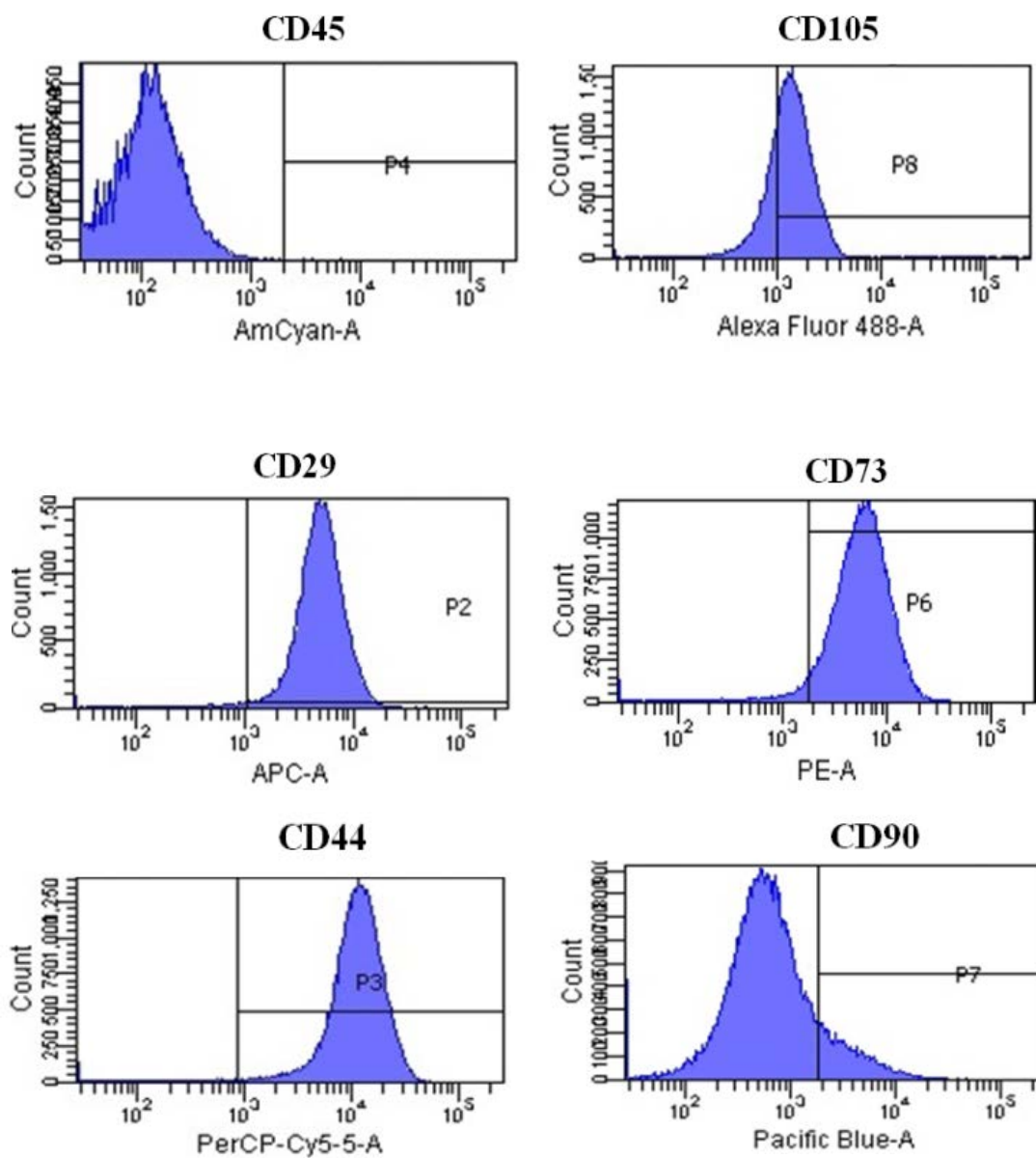
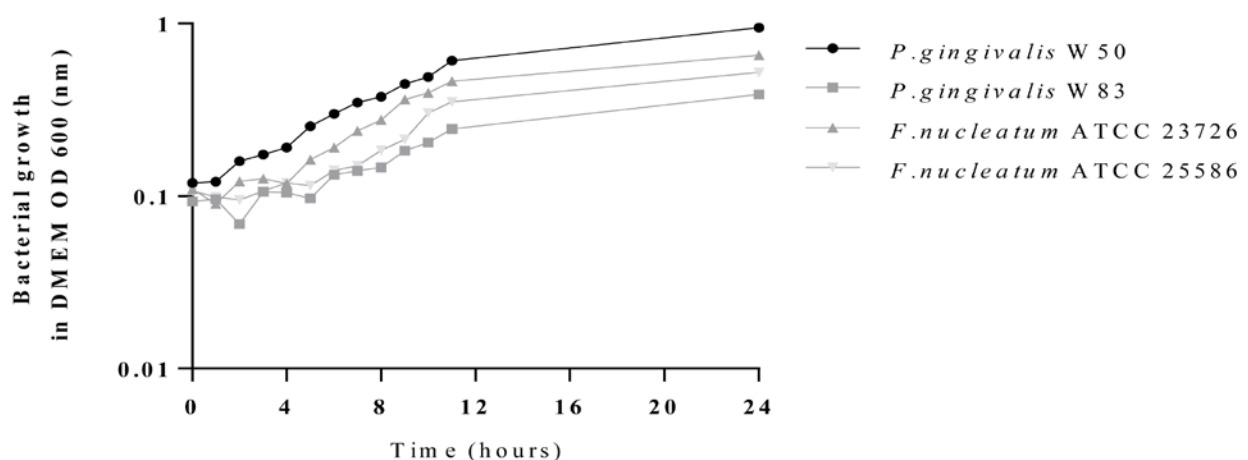


Abb. 3.2. Ausgewählte FACS-Histogramme: Oberflächenantigene CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 und CD45, n = 3

### 3.3 Bakterien-Zell-Wechselwirkungen in anaerober Ko-Kultur

#### 3.3.1 Wachstumsuntersuchung der Bakterien in Zellkulturmedium

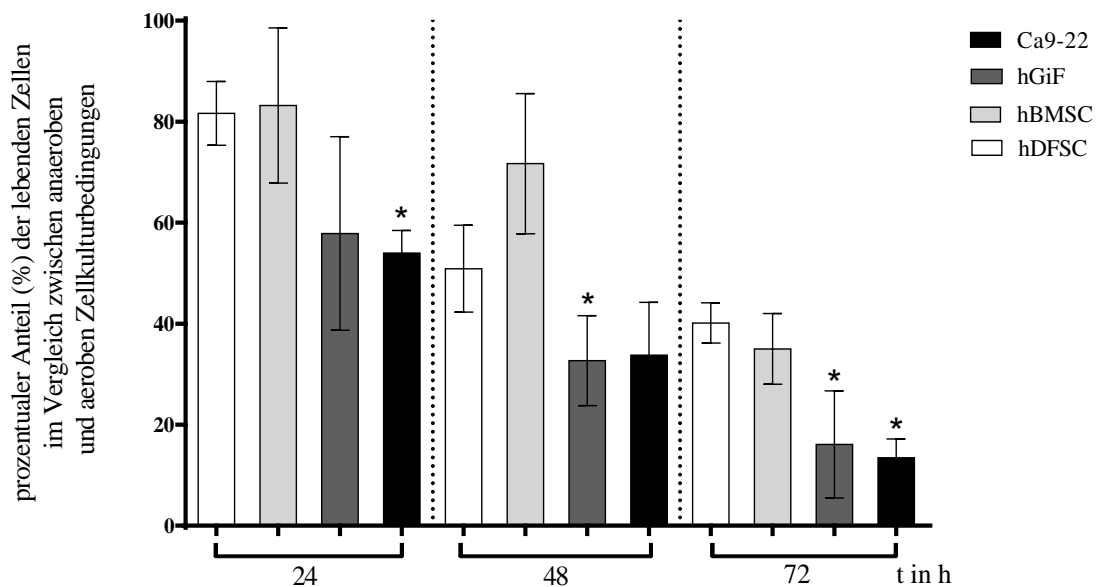
Für die Untersuchung der direkten anaeroben Bakterien-Zell-Ko-Kultur wurde das Wachstumsverhalten von *F. nucleatum* ATCC 23726, *F. nucleatum* ATCC 25586, *P. gingivalis* W50 und *P. gingivalis* W83 in DMEM-Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 24 h analysiert. In Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchung logarithmisch aufgetragen dargestellt.



**Abb. 3.3. Wachstumskinetik:** *P. gingivalis* und *F. nucleatum* in DMEM-Zellkulturmedium, gemessen über einen Zeitraum von 24 h. *P. gingivalis* W50 und *F. nucleatum* ATCC 23726 befanden sich bereits nach 3 h in der frühen exponentiellen Wachstumsphase. Hingegen wurde diese Phase bei *P. gingivalis* W83 und *F. nucleatum* ATCC 25586 erst nach etwa 8 h erreicht. Die stationäre Phase erreichten alle Stämme nach etwa 11 h Inkubation.

#### 3.3.2 Überlebensrate der humanen Zellen unter anaeroben Bedingungen

Zur Realisierung der direkten Ko-Kultur der Zellen mit obligat anaeroben Mikroorganismen wurde die Überlebensfähigkeit der Zellen unter sauerstofffreier Atmosphäre untersucht. Die Werte für die Überlebensraten der Zellen sind im Vergleich mit den Werten unter aeroben Bedingungen in Abb. 3.4 prozentual berechnet dargestellt.



**Abb. 3.4. Überlebensraten unter anaeroben Bedingungen:** Dargestellt sind die Überlebensraten von hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22 unter anaeroben Bedingungen (10 % CO<sub>2</sub>, 10 % H<sub>2</sub>, 80 % N<sub>2</sub> und 37 °C) im Vergleich zum Überleben unter aerober Atmosphäre. Die vitalen Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h mittels Auszählen nach Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC und hBMSC, hGiF sowie Ca9-22 sind durch Sternchen gekennzeichnet (\* $p < 0,05$ ).

Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten  $t = 24$  h,  $t = 48$  h und  $t = 72$  h ausgezählt. Die Überlebensraten beliefen sich für  $t = 24$  h auf hDFSC: 81,7 %, hBMSC: 83,2 %, hGiF: 58,9 % und Ca9-22: 54,0 %. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den hDFSC und den Vergleichszelllinien wurden zu diesem Zeitpunkt nur für Ca9-22 ermittelt. Nach 2 Tagen zeigten die hDFSC noch eine Überlebensrate von 50,9 %, hBMSC 71,7 %, hGiF 32,7 % und Ca9-22-Zellen 33,8 %. Hier war ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen hDFSC und hGiF sichtbar. Nach 72 h anaerober Inkubation wiesen die beiden Stammzellarten erneut mit hDFSC 40,2 %, hBMSC 35,0 % ähnliche Überlebensraten auf. Hingegen waren bei den differenzierten Zellen hinsichtlich der Überlebensrate eine statistisch signifikant geringere im Vergleich mit hDFSC-Werten vorzufinden (hGiF 16,1 % und Ca9-22 13,5 %).

### 3.4 Adhärenz- und Internalisierung

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Anfälligkeit von hDFSC für bakterielle Adhärenz und Internalisierung im Vergleich zu hBMSC, hGiF und Ca9-22 analysiert.

Die Zellen wurden jeweils mit den einzelnen Bakterienspezies in einer MOI 100 ko-inkubiert und auf das entsprechende Anheftungs- sowie Invasionspotential getestet. Morphologische Untersuchungen erfolgten mittels fluoreszenzmikroskopischer Analyse nach Lebend/Tot-Färbung sowie rasterelektronenmikroskopischer Darstellung. Eine rote Fluoreszenz der Zellen oder Bakterien entsteht nach einer Zerstörung der Zellmembran und stellt folglich tote Zellen und tote Mikroorganismen dar. Grüne Fluoreszenz entsteht bei vitalen Zellen und Bakterien (Abb. 3.5).

### 3.4.1 Adhärenz und Internalisierungswerte

Durch Bestimmung der LKZ (Lebendkeimzahl) mittels Auszählung der KBE auf Blutagar-Platten wurde die Menge adhärenter Bakterien ermittelt. Sie errechnet sich als Prozentsatz der lebenden Bakterien nach Lyse der Zellen in Relation zur initial inokulierten Gesamtkeimzahl. Die Werte der hDFSC wurden mit den Werten der hBMSC, hGiF und Ca9-22 verglichen. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse für die einzelnen Zellarten mit der jeweiligen Bakterienspezies zusammen, Abb. 3.5 und Abb. 3.6 stellen die Ergebnisse graphisch dar.

#### **Adhärenz: *F. nucleatum*-ATCC-23726-Ko-Kultur**

Beim Adhärenzverhalten von *F. nucleatum* ATCC 23726 zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC und hBMSC sowie den Ca9-22-Zellen. Dabei lag das Adhärenzvermögen der Bakterien an den Ca9-22-Zellen mit 3,5 % höchst signifikant ( $p < 0,01$ ) über dem der hDFSC (1,149 %). Der Wert für die hBMSC erwies sich als signifikant niedriger (0,174 %;  $p < 0,05$ ). Zu den hGiF gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied.

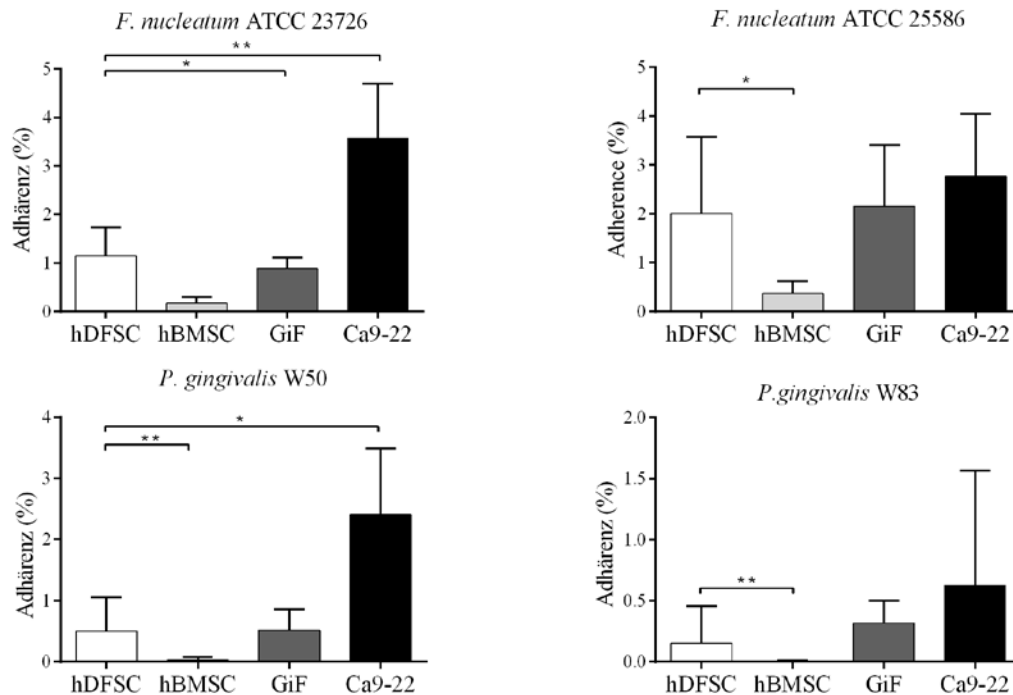
#### **Adhärenz: *F. nucleatum*-ATCC-25586-Ko-Kultur**

*F. nucleatum* ATCC 25586 zeigte eine Adhärenzrate von 2,0 % an den hDFSC. Im Vergleich war die Adhärenz an den hBMSC mit 0,3 % statistisch signifikant niedriger. An den Ca9-22-Zellen wurde mit 3,6 % das höchste Adhärenzvermögen gemessen. Statistisch ließ sich somit hinsichtlich der Adhärenz an den hBMSC ein signifikant niedrigerer Wert gegenüber den hDFSC ermitteln.

**Tabelle 3.1 Adhärenz- und Internalisierungswerte**

Adhärenz- und Internalisierungswerte sind als Prozentsatz der lebenden Bakterien nach Zelllyse in Relation zur Gesamtzahl der initial inokulierten Bakterien angegeben. Die Ergebnisse der hDFSC wurden mit den Werten der hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen verglichen. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (T-Test).

| Zelllinie / Bakterienspezies  | Adhärenz (%) <sup>a)</sup> | Internalisierung (%) <sup>a)</sup> |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| <b>hDFSC</b>                  |                            |                                    |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 1.149 $\pm$ 0.59           | 0.001 $\pm$ 0.01                   |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 2.007 $\pm$ 1.57           | 0.014 $\pm$ 0.03                   |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 0.502 $\pm$ 0.55           | 0.004 $\pm$ 0.00                   |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 0.151 $\pm$ 0.31           | 0.016 $\pm$ 0.03                   |
| <b>hBMSC</b>                  |                            |                                    |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 0.174 $\pm$ 0.12*          | 0.006 $\pm$ 0.01                   |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 0.371 $\pm$ 0.25*          | 0.043 $\pm$ 0.04                   |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 0.032 $\pm$ 0.04**         | 0.002 $\pm$ 0.00                   |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 0.006 $\pm$ 0.01           | 0.004 $\pm$ 0.00                   |
| <b>hGiF</b>                   |                            |                                    |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 0.887 $\pm$ 0.23           | 0.159 $\pm$ 0.08**                 |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 2.152 $\pm$ 1.26           | 0.167 $\pm$ 0.01                   |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 0.528 $\pm$ 0.34           | 0.038 $\pm$ 0.03                   |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 0.318 $\pm$ 0.18           | 0.037 $\pm$ 0.04                   |
| <b>Ca9-22</b>                 |                            |                                    |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 3.570 $\pm$ 1.13**         | 0.266 $\pm$ 0.35**                 |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 2.771 $\pm$ 1.46           | 0.562 $\pm$ 0.42*                  |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 2.408 $\pm$ 1.08*          | 0.005 $\pm$ 0.00                   |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 0.625 $\pm$ 0.94           | 0.028 $\pm$ 0.02                   |

**A****Adhärenz**

**Abb. 3.5. Adhärenz:** Adhärenzwerte sind als Prozentsatz der lebenden Bakterien nach Zelllyse in Relation zur Gesamtzahl der initial inokulierten Bakterien angegeben. Die Ergebnisse der hDFSC wurden mit den Werten der hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen verglichen. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test).

### Adhärenz: *P. gingivalis*-W50-Ko-Kultur

Die Ergebnisse der *P. gingivalis*-W50-Ko-Kultur verhielten sich analog zu der *F. nucleatum*-ATCC-23726-Ko-Kultur. Es war eine statistisch signifikant höhere Anzahl adhärenter Bakterien an den Ca9-22-Zellen (2,4 %) zu finden. Die hBMSC (0,03 %) wiesen signifikant weniger adhärente Spezies gegenüber den hDFSC (0,5 %) auf.

### Adhärenz: *P. gingivalis*-W83-Ko-Kultur

In der Ko-Kultur der Zellen mit *P. gingivalis* W83 zeigte sich eine statistisch signifikant geringere Adhärenz an den hBMSC gegenüber den hDFSC. Zu den differenzierten Zellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden. Insgesamt zeigte diese bakterielle Spezies das geringste Adhärenzvermögen mit einem Maximalwert von 0,62 % an den Ca9-22-Zellen.

Die Internalisierungsuntersuchung bestimmt denjenigen Anteil der Bakterien, die in die Zellen eindringen konnten. Adhärenente Keime wurden mit Hilfe rein extrazellulär wirkender



Antibiotika getötet. Nach Lyse der Zellen und Anzucht der freigesetzten intrazellulären Bakterien auf Blut-Agar-Platten konnte die Menge der internalisierten Spezies durch LKZ-Bestimmung ermittelt werden.

#### **Internalisierung: *F. nucleatum*-ATCC-23726-Ko-Kultur**

Die beiden differenzierten Zelllinien Ca9-22 (0,27 %) und hGiF (0,16 %) zeigten eine höchst signifikant größere Internalisierungsrate von *F. nucleatum* ATCC 23726 gegenüber den hDFSC (0,001 %). Zwischen den beiden Stammzellarten konnte kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden.

#### **Internalisierung: *F. nucleatum*-ATCC-25586-Ko-Kultur**

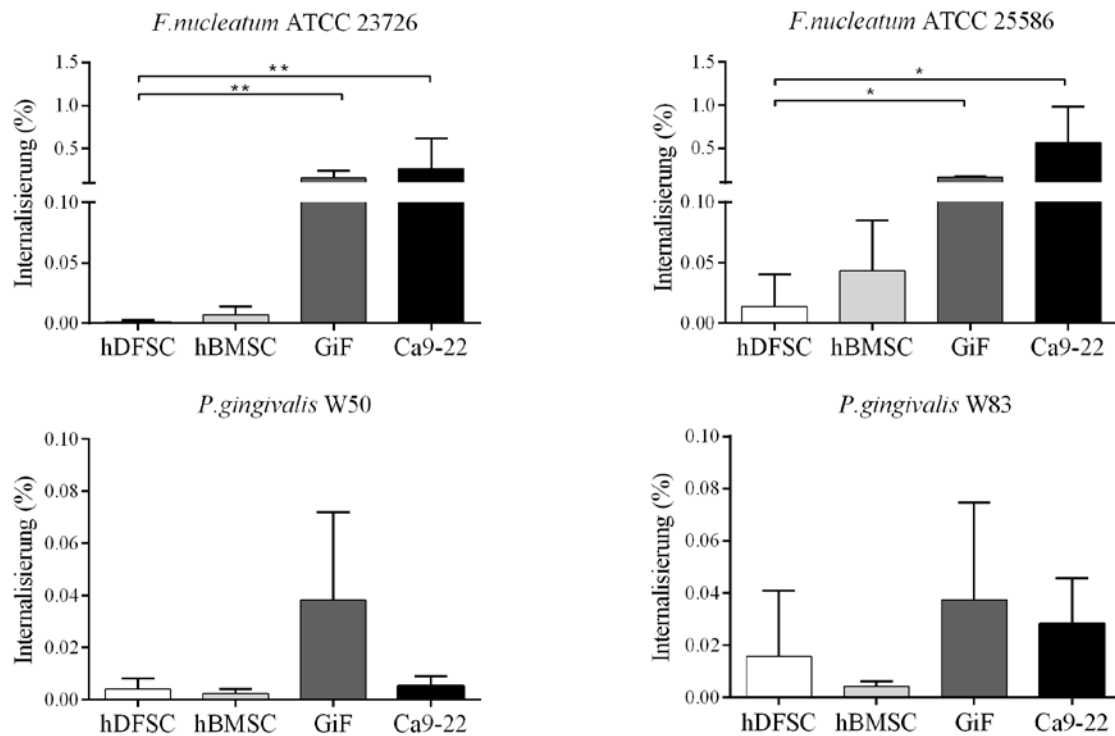
In der *F. nucleatum*-ATCC-25586-Ko-Kultur wurde die höchste Anfälligkeit für die bakterielle Invasion bei der Ca9-22-Zelllinie gemessen. Die Internalisierungsrate betrug 0,6 % und ist somit statistisch signifikant höher verglichen mit hDFSC ( $p < 0,05$ ), welche mit einer 0,01-prozentigen Internalisierungsrate die wenigsten internalisierten Bakterien aufwiesen.

#### **Internalisierung: *P. gingivalis*-W50-Ko-Kultur**

Die beiden *P. gingivalis*-Stämme zeigten bei allen Zellen ein sehr niedriges Internalisierungspotential. Der höchste Wert belief sich auf 0,04 % und wurde bei den hGiF detektiert. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen hinsichtlich der Menge internalisierter *P. gingivalis* W50 nachgewiesen werden.

#### **Internalisierung: *P. gingivalis*-W83-Ko-Kultur**

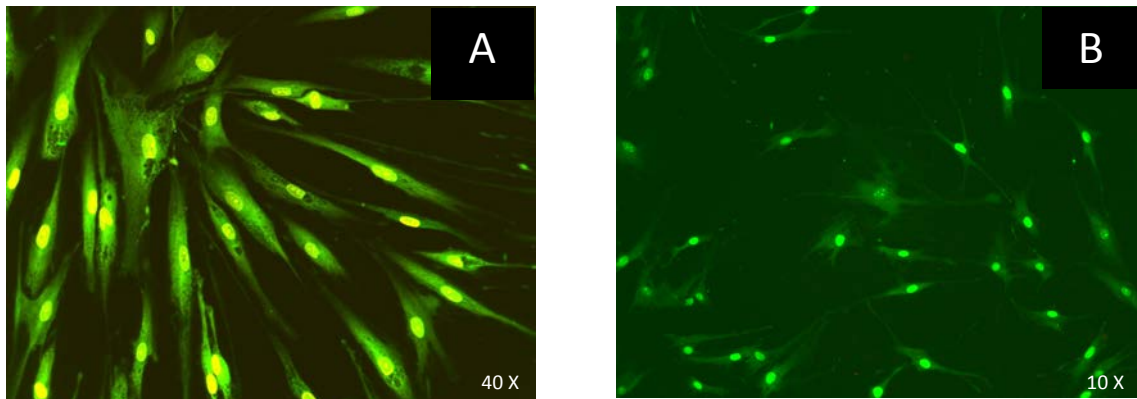
Auch in dieser Ko-Kultur zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Menge internalisierter Bakterien zwischen hDFSC und den Vergleichszelllinien. Die geringste Internalisierungsrate wurde mit 0,006 % bei hBMSC gemessen. Für hDFSC betrug die Rate internalisierter Keime 0,15 %, für die Ca9-22 0,63 % und hGiF 0,32 %.

**B****Internalisierung**

**Abb. 3.6. Internalisierung:** Internalisierungswerte sind als Prozentsatz der lebenden Bakterien nach Zelllyse in Relation zur Gesamtzahl der initial inokulierten Bakterien angegeben. Die Ergebnisse der hDFSC wurden mit den Werten der hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen verglichen. Es sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) dargestellt: \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (T-Test).

### 3.4.2 Morphologische Untersuchung der Adhärenz und Internalisierung

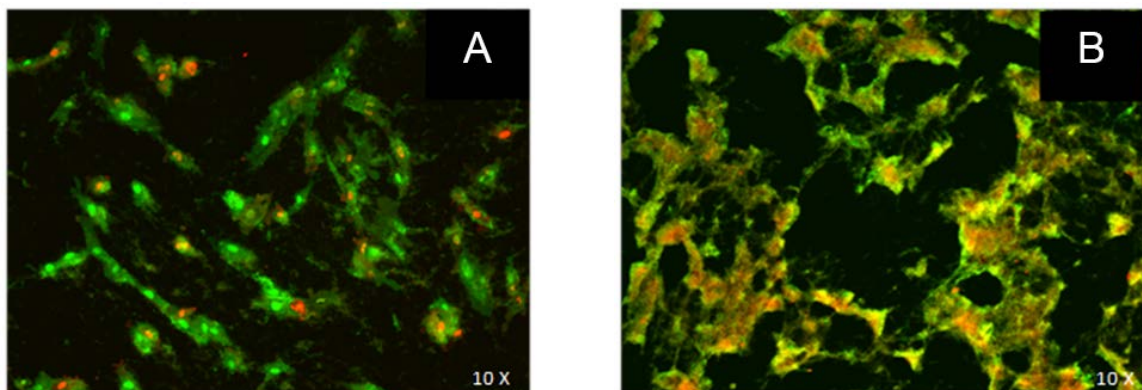
Durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der anaeroben Ko-Kultur der beiden Stammzellarten mit *F. nucleatum* und *P. gingivalis* nach Lebend/Tot-Färbung konnte das Überleben der Bakterien und Zellen visualisiert werden. Eine rote Fluoreszenz der Zellen sowie Bakterien bedeutet eine zerstörte Zellmembran und stellt folglich eine tote Zelle oder ein totes Bakterium dar. Grüne Fluoreszenz deutet auf lebende Zellen und lebende Keime hin. Abb. 3.7 A/B zeigt die Kontrolle der hDFSC und hBMSC ohne bakterielle Infektion nach 24 h, es sind ausnahmslos grün fluoreszierende Zellen sichtbar.



**Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Stammzellen nach Lebend/Tot-Färbung (t = 24 h). A) hDFSC und B) hBMSC – nach 24 h unter anaeroben Kulturbedingungen.**

### **hDFSC: Zell-Bakterien-Ko-Kultur**

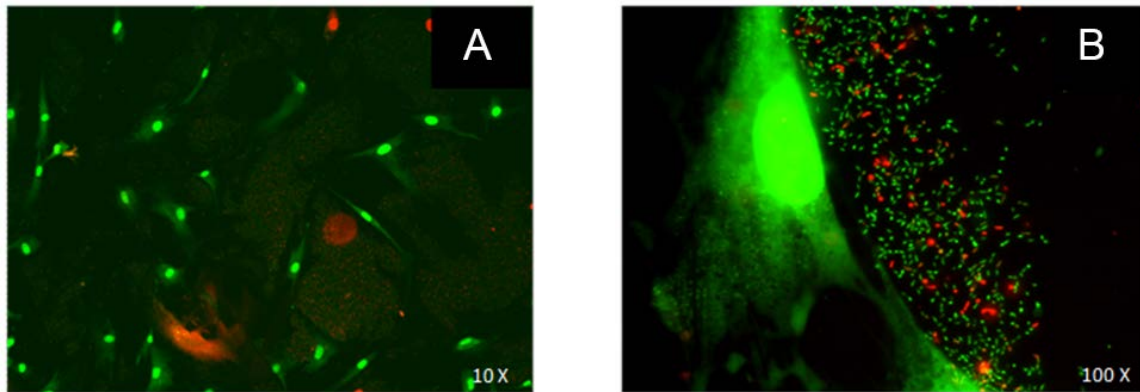
Deutlich zeichnet sich in den Abb. 3.8 das Wachstum von *F. nucleatum* ATCC 23726 (Abb. 3.8 A) und *F. nucleatum* ATCC 25586 (Abb. 3.8 B) auf den hDFSC ab. Die Zellen sind fast vollständig von den Bakterien bedeckt. Neben vornehmlich grün fluoreszierenden sind auch einige rot leuchtende Zellkerne erkennbar.



**Abb. 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur von hDFSC mit *F. nucleatum* ATCC 23726/ *F. nucleatum* ATCC 25586 nach Lebend/Tot-Färbung (t = 24 h). A) hDFSC mit *F. nucleatum* ATCC 2372, B) hDFSC mit *F. nucleatum* ATCC 25586.**

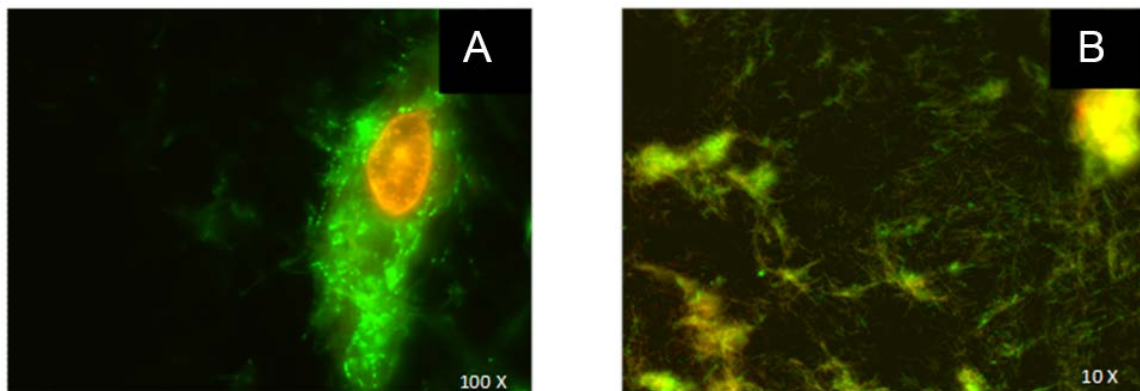
Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der

Abb. 3.9 A und B zeigen die Ko-Kultur von hDFSC mit *P. gingivalis* W50 sowie *P. gingivalis* W83. Es fällt auf, dass die Mikroorganismen mehr um die Zellen herum verteilt als an ihnen anheftend vorzufinden sind. Bis auf wenige rot leuchtende Zellen sind in Abb. 3.7 A überwiegend grün fluoreszierende hDFSC sichtbar. Die einzelne hDFSC in Abb. 3.7 B ist ebenfalls vital. Es sind auf/in der Zelle sowie um diese herum verteilt grün fluoreszierende sowie rot leuchtende Bakterien zu sehen.



**Abb. 3.9:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur von hDFSC mit *P. gingivalis* W50/*P. gingivalis* W83 nach Lebend/Tot-Färbung (t = 24 h). A) hDFSC mit *P. gingivalis* W50, B) einzelne hDFSC mit *P. gingivalis* W83.

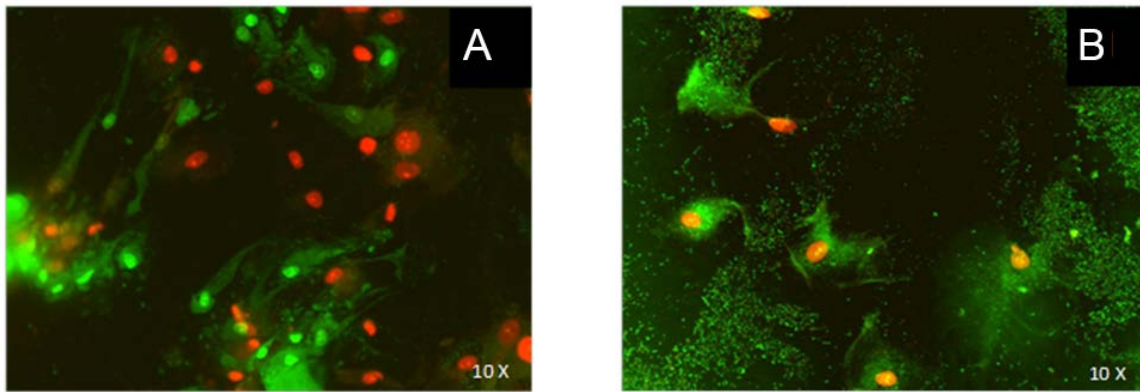
### hBMSC: Zell-Bakterien-Ko-Kultur



**Abb. 3.10:** Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur von hBMSC mit *F. nucleatum* ATCC 23726 /*F. nucleatum* ATCC 25586 nach Lebend/Tot-Färbung (t = 24 h). A) hBMSC mit *F. nucleatum* ATCC 23726, B) hBMSC mit *F. nucleatum* ATCC 25586.

Die Abb. 3.10 A zeigt eine rot fluoreszierende hBMSC-Zelle mit adhärennten und internalisierten *F. nucleatum*-ATCC-23726-Spezies. Stäbchenförmige *F. nucleatum*-ATCC-25586-Bakterien sind in Abb. 3.10 B erkennbar, eine einzelne hBMSC ist ebenfalls am Bildrand zu sehen.

Abb. 3.11 stellt die Ko-Kultur von *P. gingivalis* W50 (Abb. 3.11 A) und *P. gingivalis* W83 (Abb. 3.11 B) mit hBMSC dar. Im Gegensatz zu den *F. nucleatum*-Ko-Kulturen zeigen sich die Bakterien hier in haufenartiger Anordnung um die Zellen herum verteilt. Es sind in dieser Ko-Kultur vorwiegend rot fluoreszierende hBMSC sichtbar.

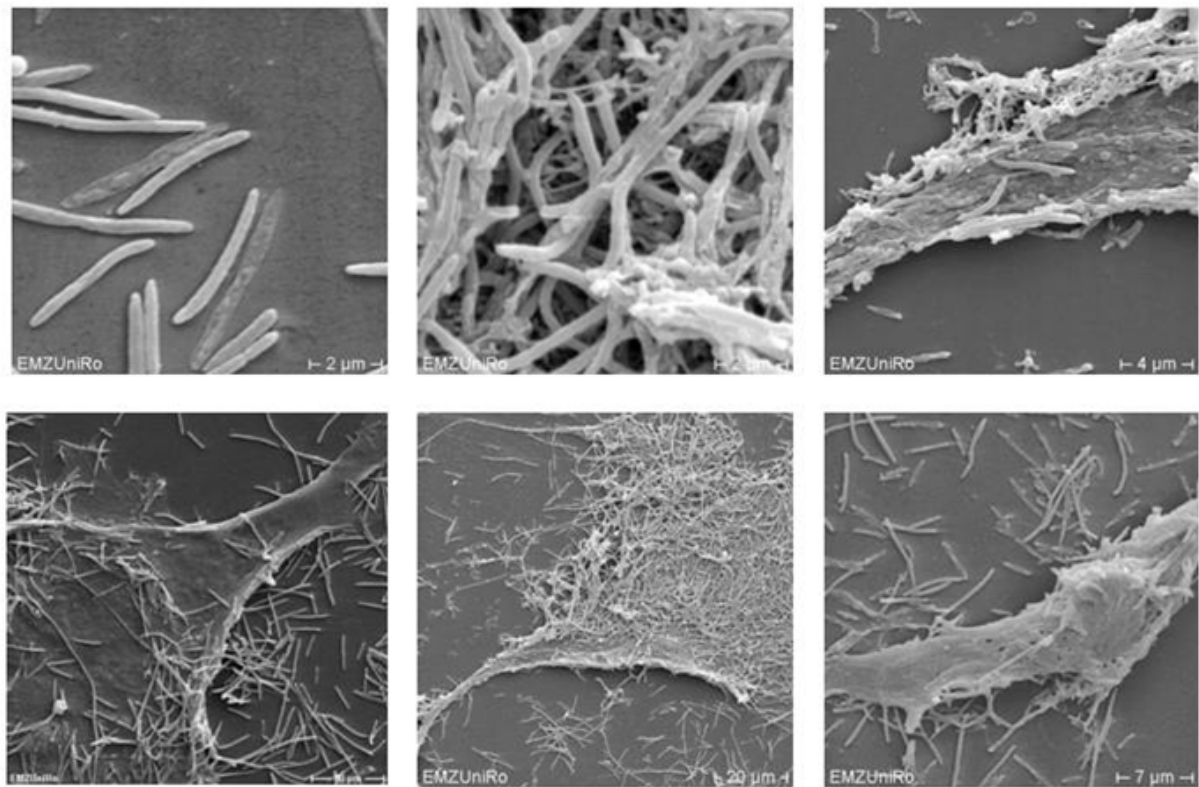


**Abb. 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur von hDFSC mit *P. gingivalis* W50/ *P. gingivalis* W83 nach Lebend/Tot-Färbung (t = 24 h). A) hDFSC mit *P. gingivalis* W50, B) hDFSC mit *P. gingivalis* W83.**

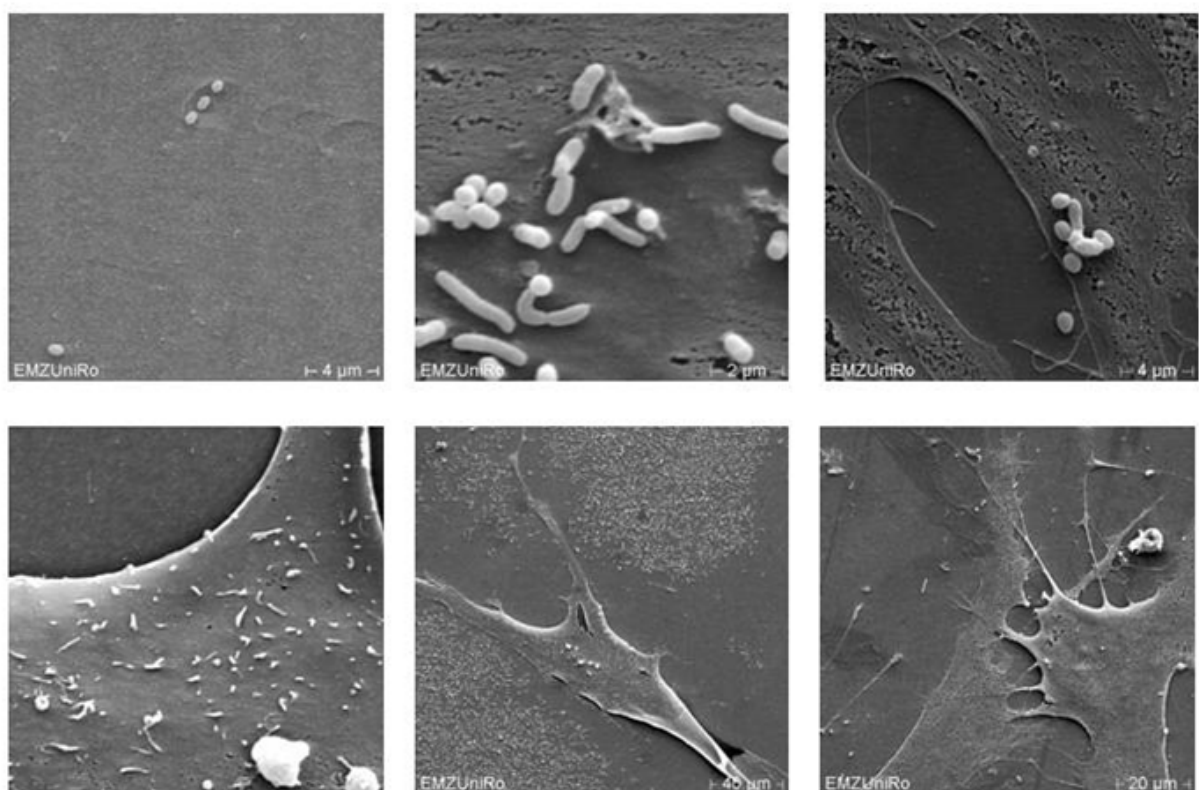
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den *F. nucleatum*-Ko-Kulturen eine deutlich größere Anzahl lebender humaner Zellen vorzufinden ist und die Bakterien eine höhere Affinität zu den Zellen aufweisen. Hingegen imponieren in den *P. gingivalis*-Ko-Kulturen vermehrt rot leuchtende humane Zellen und die pathogenen Keime sind vornehmlich um diese herum verteilt zu sehen.

Zur Visualisierung der Adhärenz der Keime an den dentalen Stammzellen erfolgte eine rasterelektronenmikroskopische Dokumentation der hDFSC-Ko-Kultur mit *F. nucleatum* ATCC 25586 und *P. gingivalis* W50. In Abb. 3.12 ist zu erkennen, dass *F. nucleatum* ATCC 25586 sich zahlreich an die hDFSC anheftet, wohingegen *P. gingivalis* W50 (Abb. 3.11) um die Zellen herum verteilt und nur in geringer Anzahl an ihnen anheftend vorzufinden ist.

In der *F. nucleatum*-Ko-Kultur ist ein flächiges Wachstum der Keime auf den Zellen zu beobachten, die Bakterien zeigen verglichen mit *P. gingivalis* W50 eine größere Adhärenz an den Zellen. Diese Beobachtungen stimmen mit den fluoreszenzmikroskopischen Analysen überein.



**Abb. 3.12. Rasterelektronenmikroskopische Analyse:** Adhärenz von *F. nucleatum* ATCC 25586 an hDFSC.



**Abb. 3.13. Rasterelektronenmikroskopische Analyse:** Adhärenz von *P. gingivalis* W50 an hDFSC.



### 3.5 Zytokinantwort (IL-8-Sekretion)

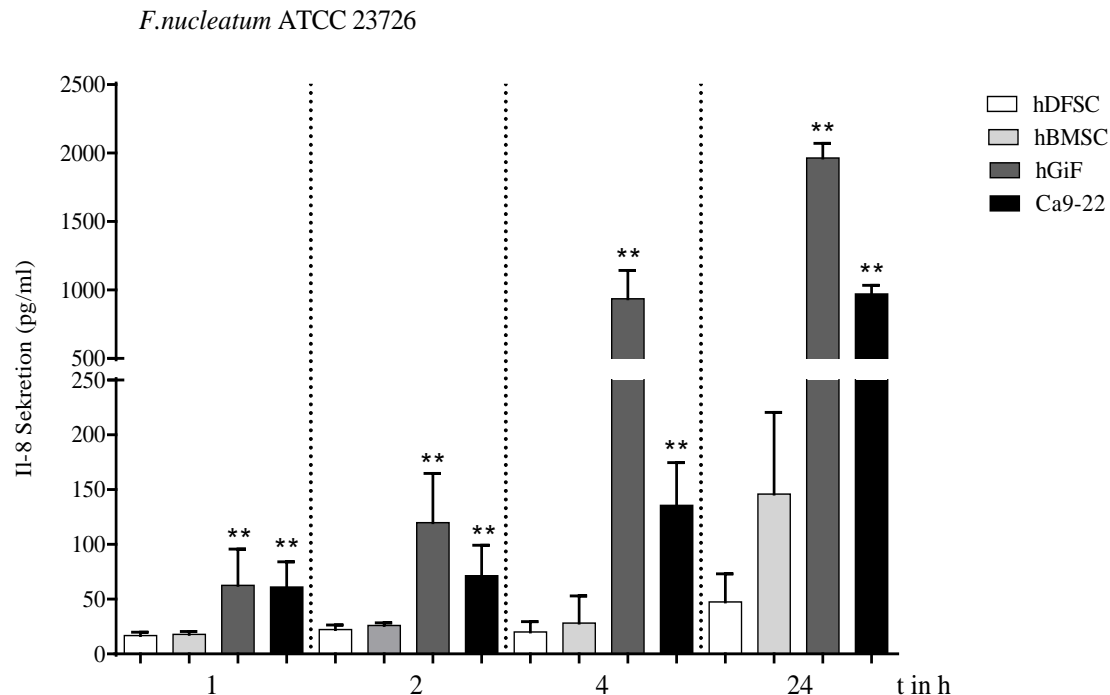
Ziel dieser Untersuchung war es, die immunologische Reaktion der hDFSC auf die Ko-Kultur mit parodontopathogenen Spezies zu analysieren und mit hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu vergleichen. Als Parameter wurde die Sekretion von IL-8 herangezogen. Nach 1, 2, 4 und 24 Stunden wurde das sezernierte Zytokin im Überstand der Kulturen gemessen. Eine Kalibrier-Gerade mit Tier-Serum diente dabei als Grundlage für die Konzentrations-Berechnungen.

Die Tabelle 3.2 fasst die Ergebnisse der Analyse zusammen. Zusätzlich dienen die Abbildungen 3.14 bis 3.17 der graphischen Darstellung der Werte (diese sind als vergleichende Übersichtsdarstellungen mit allen Zellen in einer Graphik zusätzlich im Anhang zu finden, siehe Abb. A 1 und 2).

**Tabelle 3.2 IL-8-Sekretion von hDFSC im Vergleich zu hBMSC, hGiF und Ca9-22**

IL-8-Konzentrationen wurden mit ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung und \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test) dargestellt. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor.

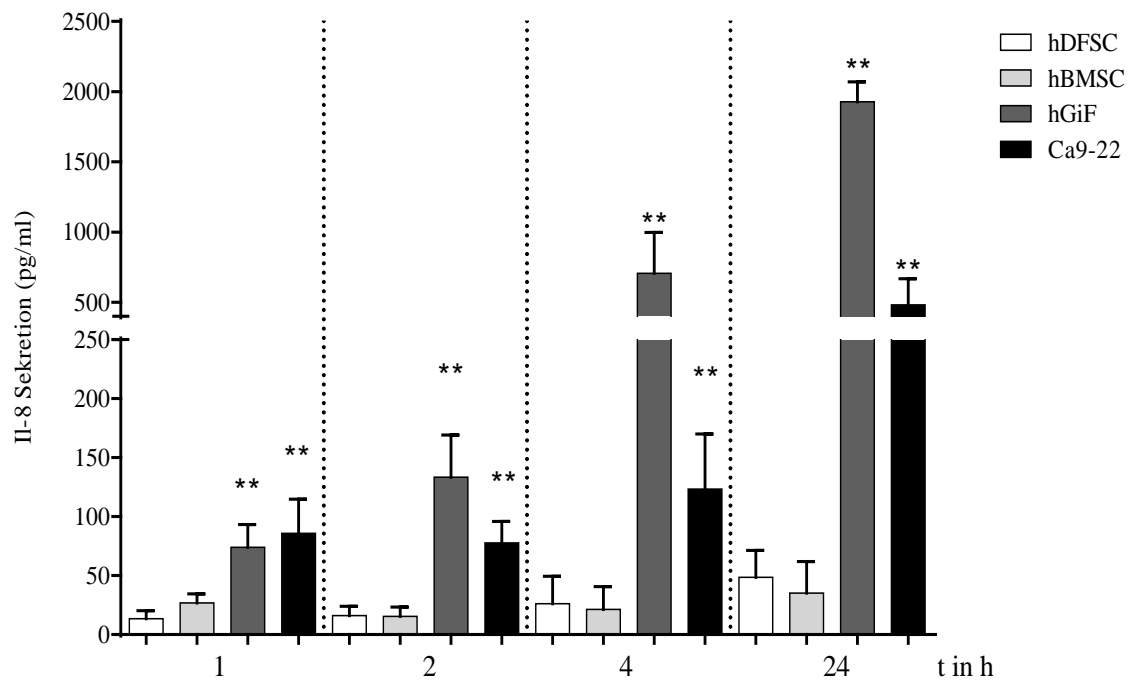
| Zelllinie / Bakterienspezies  | IL-8 Konzentration (pg/ml) <sup>a)</sup> |                |                 |                  |
|-------------------------------|--|----------------|-----------------|------------------|
|                               | 1h                                       | 2h             | 4h              | 24h              |
| <b>hDFSC</b>                  |  |                |                 |                  |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 16.9 ± 3.7                               | 23.2 ± 4.1     | 16.1 ± 3.8      | 47.5 ± 25.7      |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 13.7 ± 8.0                               | 16.2 ± 7.7     | 27.0 ± 26.6     | 48.6 ± 22.7      |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 4.7 ± 3.2                                | 14.2 ± 18.4    | 11.9 ± 5.2      | 22.4 ± 10.1      |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 6.8 ± 1.5                                | 12.6 ± 3.9     | 22.4 ± 11.1     | 27.8 ± 11.3      |
| <b>hBMSC</b>                  |  |                |                 |                  |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 18.6 ± 2.2                               | 26.0 ± 2.4     | 30.8 ± 27.9     | 145.9 ± 74.7     |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 27.7 ± 8.5                               | 15.4 ± 7.9     | 21.4 ± 19.4     | 35.3 ± 26.7      |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 20.5 ± 0.3*                              | 23.1 ± 5.6     | 46.7 ± 3.6      | 35.0 ± 6.8       |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 11.6 ± 2.8*                              | 8.2 ± 4.5      | 19.1 ± 14.5     | 19.3 ± 10.0      |
| <b>hGiF</b>                   |  |                |                 |                  |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 62.7 ± 32.9**                            | 119.9 ± 44.8** | 936.7 ± 206.0** | 1964.0 ± 106.6** |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 73.9 ± 19.3**                            | 133.3 ± 35.9** | 706.4 ± 291.9** | 1928.0 ± 141.7** |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 102.3 ± 45.5**                           | 61.4 ± 21.8*   | 108.5 ± 44.41** | 57.0 ± 28.5*     |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 53.5 ± 18.0*                             | 50.0 ± 6.7**   | 84.3 ± 19.5**   | 87.6 ± 17.7**    |
| <b>Ca9-22</b>                 |  |                |                 |                  |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 23726 | 69.4 ± 15.6**                            | 71.3 ± 27.0**  | 144.8 ± 38.5**  | 991.1 ± 65.3**   |
| <i>F.nucleatum</i> ATCC 25586 | 80.3 ± 36.4**                            | 75.4 ± 25.1**  | 129.4 ± 51.7**  | 551.8 ± 116.5**  |
| <i>P.gingivalis</i> W50       | 60.4 ± 35.6**                            | 106.8 ± 57.0** | 55.5 ± 17.9**   | 65.3 ± 8.1*      |
| <i>P.gingivalis</i> W83       | 26.5 ± 8.8*                              | 97.2 ± 6.2**   | 126.5 ± 25.4**  | 169.4 ± 27.2**   |

**F. nucleatum-ATCC-23726-Ko-Kultur**

**Abb. 3.14: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22 nach Ko-Kultur mit *F. nucleatum* ATCC 23726.** Graphisch dargestellt sind die im ELISA-Assay ermittelten Zytokinmengen in pg/ml aus den Überständen der Ko-Kulturen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 24 h Ko-Inkubation. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

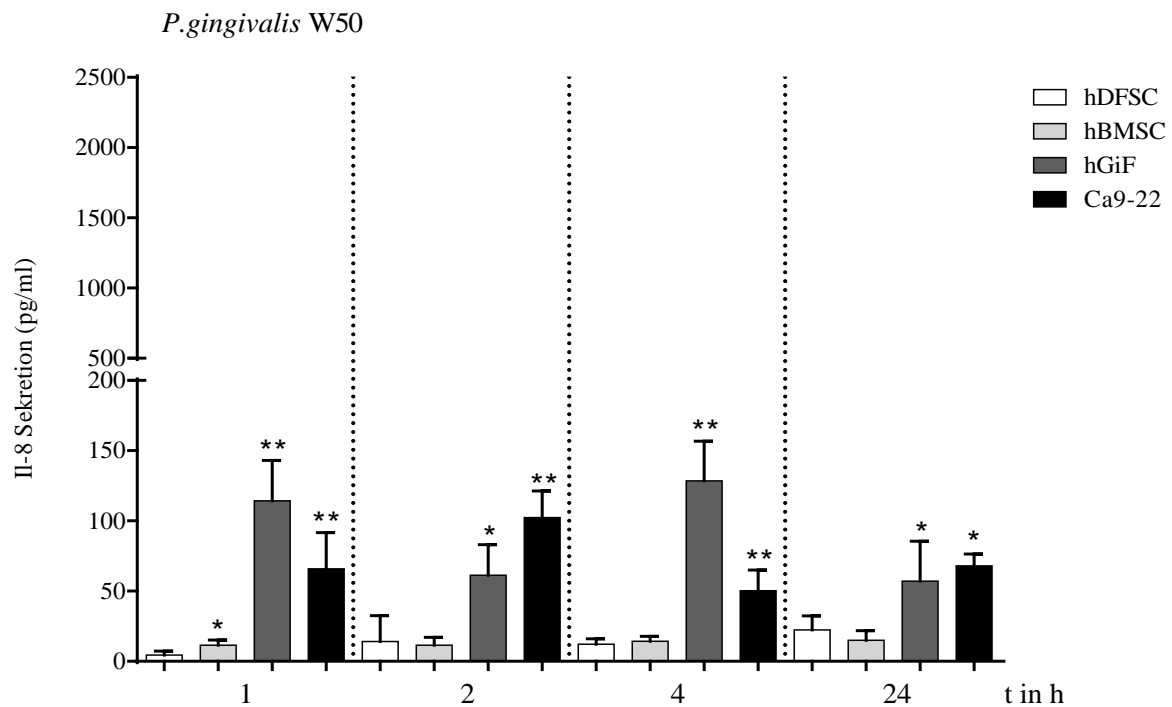
In der *F. nucleatum*-ATCC-23726-Ko-Kultur konnte bei allen Zellen eine Zunahme der IL-8-Konzentration im Überstand in Abhängigkeit der Infektionsdauer dokumentiert werden (Abb. 3.14.). Während sich die hDFSC und die hBMSC kaum unterschieden, war die Menge des sezernierten IL-8 aus den Ko-Kulturen der beiden differenzierten Zelllinien zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant größer als in der hDFSC-Ko-Kultur ( $p < 0,01$ ). Die höchsten Werte konnten nach 24 h bei den hGiF mit 1963,6 pg/ml detektiert werden.



**F. nucleatum-ATCC-25586-Ko-Kultur***F. nucleatum* ATCC 25586

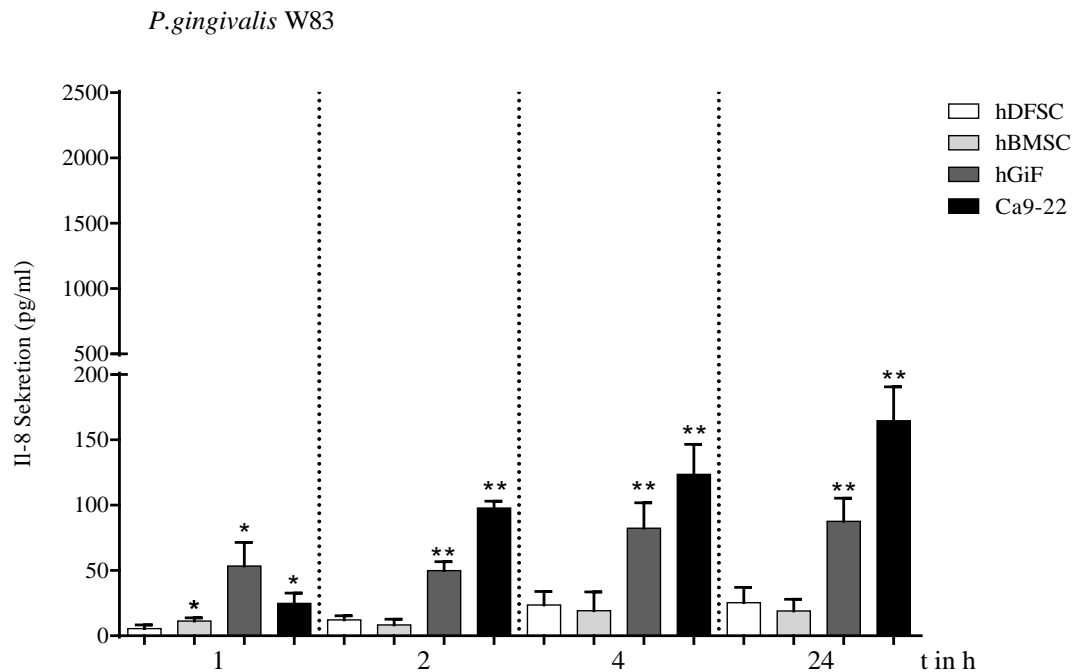
**Abb. 3.15: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen nach Ko-Kultur mit *F. nucleatum* ATCC 25586.** Graphisch dargestellt sind die im ELISA-Assay ermittelten Zytokinmengen in pg/ml aus den Überständen der Ko-Kulturen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 24 h Ko-Inkubation. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Analog zu den zuvor für *F. nucleatum* ATCC 23726 beschriebenen Ergebnissen konnten in der *F. nucleatum*-ATCC-25586-Ko-Kultur ähnliche Werte detektiert werden. Die hGiF und Ca9-22-Zellen zeigten jeweils eine statistisch höchst signifikant stärkere Zytokinausschüttung als die hDFSC ( $p < 0,01$ ). Auch hier wurde die größte Zunahme an sezerniertem IL-8 in der hGiF-Ko-Kultur ermittelt und beträgt 1927,8 pg/ml. Ebenfalls waren in dieser Ko-Kultur die Werte für die hBMSC denen der hDFSC sehr ähnlich und lagen bis auf  $t = 1$  h leicht unter den für die hGiF und Ca9-22 gemessenen Werten (Abb. 3.15).

**P. gingivalis-W50-Kultur**

**Abb. 3.16: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen nach Ko-Kultur mit *P. gingivalis* W50.** Graphisch dargestellt sind die im ELISA-Assay ermittelten Zytokinmengen in pg/ml aus den Überständen der Ko-Kulturen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 24 h Ko-Inkubation. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Im Gegensatz zu den *F. nucleatum*-Ko-Kulturen kam es bei *P. gingivalis* W50 nicht zu einer zeitabhängigen Zunahme des Zytokin-Levels. Ebenfalls lag hier das IL-8-Level der hGiF und Ca9-22-Zellen zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant über dem der hDFSC. Es konnte ein Maximum von 128,5 pg/ml bei  $t = 4$  h für hGiF erhoben werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den hDFSC und den hBMSC wurde nur bei  $t = 1$  h ermittelt, wobei der Wert für die hBMSC über dem der hDFSC lag (Abb. 3.16).

**P. gingivalis-W83-Kultur**

**Abb. 3.17: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen nach Ko-Kultur mit *P. gingivalis* W83.** Graphisch dargestellt sind die im ELISA-Assay ermittelten Zytokinmengen in pg/ml aus den Überständen der Ko-Kulturen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 24 h Ko-Inkubation. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

In der *P. gingivalis*-W83-Ko-Kultur kam es, entsprechend der *F. nucleatum*-Ko-Kulturen, zu einer zeitabhängigen Steigerung der IL-8-Konzentrationen. Auch hier wurden wie bei *P. gingivalis* W50 insgesamt sehr niedrige Werte mit einem Maximum von 164,7 pg/ml bei  $t = 24$  h für die Ca9-22-Zellen ermittelt. Es zeigte sich wie in allen vorherigen Ko-Kulturen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den hDFSC und den hGiF ebenso wie der Ca9-22-Zelllinie (Abb. 3.17). Die hBMSC sezernierten in dieser Ko-Kultur ebenso wie in der vorherigen nur zum Zeitpunkt  $t = 1$  h signifikant mehr IL-8 als die hDFSC.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die differenzierten Zelllinien Ca9-22 und hGiF konstant die stärkste IL-8-Sekretion vorwiesen. Es wurde in allen Ko-Kulturen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den hDFSC und den differenzierten Zelllinien gemessen. Zu fast allen analysierten Zeitpunkten wurde durch *F. nucleatum* eine stärkere Zytokin-Antwort hervorgerufen als durch *P. gingivalis*. Mit zunehmender Infektionsdauer stieg, mit Ausnahme der *P. gingivalis*-W50-Ko-Kultur, die Menge an sezerniertem IL-8 im Überstand an.

## 4 Diskussion

Dentale Stammzellen sind als Vorläuferzellen an der Bildung und Entwicklung dentaler ebenso wie parodontaler Strukturen beteiligt. Im adulten Individuum haben diese Zellen einen maßgeblichen Anteil an der Geweberegeneration nach Trauma oder infektionsbedingten Gewebszerstörungen (Haddouti *et al.* 2009). Die Erfüllung dieser Aufgaben müssen sie in einem Kompartiment des Körpers gewährleisten, welches einer permanenten bakteriellen Exposition unterliegt.

Die vorliegende Arbeit untersucht in einer vergleichenden Analyse die Interaktionen von humanen dentalen Stammzellen mit zwei ausgewählten anaeroben Bakterienspezies, welche häufig im Rahmen einer Parodontitis auftreten und eng mit der Pathogenese dieser Erkrankung assoziiert sind. Das Verhalten der hDFSC wurde hinsichtlich direkter bakterieller Stimulation analysiert und gegenüber drei weiteren humanen Zelllinien unterschiedlichen Differenzierungsgrades bewertet. Multipotente Knochenmarks-Stammzellen, terminal differenzierte primäre Gingivafibroblasten sowie epitheliale Gingiva-Karzinomzellen dienten als Vergleichszelllinien. Um Voraussetzungen zu schaffen, welche den natürlich in der parodontalen Tasche herrschenden Bedingungen sehr ähnlich sind, wurde ein anaerobes Ko-Kulturmodell etabliert. In diesem Setup konnten die direkten Wechselwirkungen der vitalen parodontopathogenen Keime mit humanen dentalen Stammzellen (und den Vergleichszelllinien) unter anaeroben Bedingungen untersucht werden. Fast alle bisherigen Studien beschränken sich auf die anaerobe Anzucht der Keime, führen jedoch die Ko-Kultur-Experimente aerob durch. Diese Tatsache war auch beim Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den bisherigen Untersuchungen zu berücksichtigen.

Bei der Analyse der Bakterien-Zell-Interaktionen interessierte als Erstes, wie unterschiedlich stark Zellen in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad eine Anfälligkeit zur Adhärenz und Internalisierung durch pathogene Bakterienspezies aufweisen. Weiterhin sollte die immunologische Reaktion der dentalen Stammzellen auf die direkte Ko-Kultivierung mit den Keimen hin untersucht werden. Als Parameter wurde die Stimulierung einer proinflammatorischen Zytokinantwort anhand der IL-8-Sekretion analysiert. Es ist bekannt, dass Stammzellen besondere immunologische Fähigkeiten aufweisen (Wada *et al.* 2009). Hieraus ergab sich die Annahme, dass lokale (dentale) Stammzellen aufgrund ihrer geweberegenerativen und immunmodulatorischen Aufgaben möglicherweise weniger stark auf bakterielle Stimulation reagieren.

## 4.1 Anaerobe Bakterien-Zell-Ko-Kultur

Ziel dieses Abschnittes der Untersuchung war die Etablierung eines Ko-Kultur-Modelles, in dem vitale Bakterien und Zellen in direktem Kontakt interagieren können. Die bisherigen Studien zu Bakterien-Zell-Interaktionen beschränken sich, bis auf wenige Ausnahmen, auf die Ko-Kultur unter aeroben Bedingungen. Die obligat anaeroben Keime *P. gingivalis* und *F. nucleatum* sterben nach kurzer Zeit in oxygenierter Umgebung und können nicht mehr aktiv mit den Zellen in Wechselwirkung treten (Diaz und Rogers 2004). Bei anaeroben Bakterien hat dies zur Folge, dass die Effekte der bakteriellen Infektion nicht über längere Zeiträume beobachtet werden können. Vor allem die direkten Interaktionen in Form von Adhärenz und Invasion der pathogenen Spezies müssen von den Mikroorganismen und Zellen aktiv durchgeführt werden (Lamont *et al.* 1995; Belton *et al.* 2001). In den bisherigen Arbeiten konnten deshalb nur sehr kurze Zeiträume für die Ko-Kultur (unter aeroben Bedingungen) gewählt werden oder es war ein Absterben der Keime im Verlauf der Experimente zu tolerieren (Hasegawa *et al.* 2007; Saito *et al.* 2009; Lamont *et al.* 1995; Meyer *et al.* 1996). Es liegt hierbei die Vermutung nahe, dass die Effekte, welche durch aktive vitale Mikroorganismen hervorgerufen werden, sich von denen toter unterscheiden können (Belton *et al.* 2001).

Mit der Etablierung des anaeroben Ko-Kulturmodelles wurden Versuchsbedingungen geschaffen, welche einerseits die natürlichen Verhältnisse der parodontalen Tasche simulieren und auf der anderen Seite ein Überleben der Bakterien während der Untersuchung der Bakterien-Zell-Interaktionen gewährleisten. Da obligat anaerobe Keime in Kontakt mit Sauerstoff sterben (Fredette *et al.* 1967; Loesche 1969; Tally *et al.* 1975; Nakayama 1994), wurden die humanen Zellen auf ihre Toleranz bezüglich der für die Versuche notwendigen anaeroben Bedingungen getestet. Aus der Arbeit von Dos Santos (2010) ist bekannt, dass hBMSC unter einem geringen Sauerstoffpartialdruck überleben und eine erhöhte Zellteilungsrate aufweisen. Die Autoren verwendeten in ihren Untersuchungen eine zweiprozentige Sauerstoffsättigung. Grundlage der Studie ist die Überlegung, dass im Knochenmark, dem Ursprungsort der hBMSC, physiologisch ein geringerer Sauerstoffpartialdruck als in den meisten anderen Kompartimenten des Körpers herrscht (Grayson *et al.* 2006). Als ursächlich für die schnellere Expansion der Zellen werden die zu einem früheren Zeitpunkt einsetzende Teilung der Zellen sowie eine höhere Effizienz des zellulären Stoffwechsels beschrieben. Stammzellen aus der Pulpa reagieren auf hypoxische Bedingungen ebenfalls mit einer Anpassung des Stoffwechsels sowie der Expression von

Angiogenesefaktoren (Aranha *et al.* 2010). Auch für die Ca9-22-Zellen konnte bereits ein Überleben unter Hypoxie (2 % Sauerstoffpartialdruck) bis zu 48 h dokumentiert werden (Yoshida *et al.* 2009).

In den vorliegenden Untersuchungen ergab sich nach 24 h unter anaeroben Bedingungen eine Überlebensrate von 81,7 % für die dentalen Stammzellen und 83,7 % für die hBMSC. Für die differenzierten Zellen beliefen sich die Werte auf 58,9 % (hGiF) und 54,0 % (Ca9-22) im Vergleich zu aerober Inkubation. Damit zeigen die hDFSC eine statistisch signifikant höhere Überlebensrate als die Ca9-22-Zellen. Zum Zeitpunkt  $t = 48$  h waren noch 50,9 % der dentalen Stammzellen vital. Damit hatten sie auch zu diesem Zeitpunkt eine statistisch signifikant höhere Überlebensrate als die höher differenzierten hGiF (32,7 %). Um nur knapp 10 % reduzierte sich die Anzahl vitaler hDFSC nach weiteren 24 h in sauerstofffreier Umgebung und betrug damit zu  $t = 72$  noch 40,2 %. Verglichen mit hDFSC waren bei den differenzierten Zellen hinsichtlich der Überlebensrate statistisch signifikant geringere Werte vorzufinden (hGiF 16,1 % und Ca9-22 13,5 %). Allgemein zeigten hBMSC ähnlich hohe Überlebensraten wie die hDFSC. Wie auch von Dos Santos (2010) vermutet, scheinen Zellen mit Stammzellcharakter eine höhere Toleranz bezüglich anaerober Lebensbedingungen aufzuweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte dieses bereits für hBMSC beschriebene Phänomen auch für hDFSC gezeigt und für die Knochenmarksstammzellen erneut bestätigt werden.

Zur weiteren Etablierung des anaeroben Versuchsmodells wurden das Wachstum und Überleben der Bakterien in DMEM-Zellkulturmedium getestet. Es zeigte sich in der Analyse ein physiologisches Wachstum aller vier bakteriellen Spezies. Mit diesem Ergebnis und dem Überleben der Zellen unter sauerstofffreien Bedingungen bis zu 72 h erwies sich das anaerobe Ko-Kulturmodell als geeignet für die Untersuchung der Interaktionen zwischen dentalen Stammzellen und parodontopathogenen Anaerobiern. Während des für die folgenden Experimente benötigten Untersuchungszeitraumes von maximal 24 h blieben die Zellzahlen weitestgehend konstant.

Aufgrund der noch sehr lückenhaften Studienlage zu direkten Interaktionen von anaeroben Bakterien mit Zellen kann als Vergleich aus der Literatur bisher nur auf die Untersuchungen von Dabija-Wolter *et al.* (2009) zurückgegriffen werden. Die Autoren dieser Studie führten anaerobe Ko-Kultur-Versuche mit Fibroblasten durch. Es wurden keine morphologischen Veränderungen oder ein Absterben der Zellen unter sauerstofffreien Bedingungen beobachtet und das dort angewandte Versuchsdesign als funktionell bestätigt. Zudem konnten erste

Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit etablierten anaeroben Ko-Kultur-Modelles bereits von der eigenen Arbeitsgruppe veröffentlicht werden (Kriebel et al. 2013).

## 4.2 Vergleichende Analyse der Bakterien-Zell-Interaktionen

Unlängst sind lokale, nicht ausdifferenzierte Vorläuferzellen als Teil des komplexen parodontalen Systems bekannt geworden. Lokale dentale Stammzellen nehmen eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, Wundheilung und Immunregulation ein (Phinney und Prockop 2007). Bei Veränderung der Keimflora hin zu vornehmlich anaeroben Spezies im Rahmen einer parodontalen Erkrankung sind die Zellen des Parodonts der Auseinandersetzung mit hoch pathogenen Mikroorganismen und deren zahlreichen Virulenzfaktoren ausgesetzt. Ob auch gewebständige dentale Stammzellen von direkten bakteriellen Interaktionen beeinflusst werden und wie stark diese Wechselwirkungen ausfallen, ist bisher kaum untersucht. Auch im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz dentaler Stammzellen ist die Frage nach dem Einfluss oraler Pathogene von Bedeutung.

### 4.2.1 Adhärenz- und Internalisierungsuntersuchung

Bisherige Studien zu Interaktionen von Progenitoren aus dentalen/parodontalen Geweben mit oralen Keimen beschränken sich auf die Untersuchung des Einflusses einzelner bakterieller Virulenzfaktoren auf das Verhalten der Zellen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass LPS sowohl von *P. gingivalis* als auch von *E. coli* spezifische immunologische Reaktionen in dentalen Stammzellen hervorruft (Chatzivasileiou et al. 2013; Tomic et al. 2011; He et al. 2014; Chang et al. 2005; Zhang et al. 2013). Zudem wurde eine verstärkte Migration von hDFSC nach Kontakt mit LPS beobachtet (Chatzivasileiou et al. 2013).

In der bisher einzigen Studie, welche in einer Ko-Kultur die direkten Wechselwirkung von Stammzellen mit Bakterien (*Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis*) untersucht, wurde eine signifikante Wachstumshemmung der Keime durch die hBMSC (Meisel et al. 2011) dokumentiert. Meisel *et al.* vermuten, dass die antimikrobielle Wirkung der hBMSC auf eine zytokininduzierte IDO-Expression (Indoleamine-2,3-Dioxygenase) zurückzuführen ist.

Neben den bereits in einigen Studien an dentalen Stammzellen untersuchten Wechselwirkungen mit LPS sind die Fähigkeit zur Adhärenz an Zellen sowie zur Internalisierung in diese weitere wichtige Virulenzmechanismen parodontopathogener Keime.

Für die Pathogenese der Parodontitis gilt die Möglichkeit zur Anheftung an die Zellen sowie die Invasion in parodontale Gewebe als wichtiger Schritt (Bolstad *et al.* 1996; Han *et al.* 2000). Für die Progredienz und Chronifizierung der Entzündung spielt hingegen vermutlich die daraus resultierende intrazelluläre Persistenz der Pathogene eine tragende Rolle (Straube *et al.* 1993). Für die Bakterien selbst ist diese Eigenschaft als evolutionärer Vorteil zu sehen, da sie sich so maskiert und geschützt vor der Wirtsabwehr replizieren und auch angrenzende Zellen infizieren können (Tamai *et al.* 2011).

Adhärenz und Internalisierung wurden *in vitro* für verschiedene orale Zelllinien sowie an Zell-Multilayern und parodontalen Gewebsbiopsien mit den parodontopathogenen Spezies *P. gingivalis* und *F. nucleatum* nachgewiesen (Sandro *et al.* 1994; Lamont *et al.* 1995; Andrian *et al.* 2004; Amornchat *et al.* 2003; Han *et al.* 2000). Sandro *et al.* (1994) zeigten für Epithelzellen aus parodontalen Taschenbiopsien, dass verschiedene *P. gingivalis*-Stämme neben der Fähigkeit zur Adhärenz in der Lage sind, *in vitro* in die Zellen zu internalisieren. Die Studie von Lamont und Kollegen (1995) bestätigte dieses Verhalten an gingivalen Epithelzellen mit unterschiedlichen *P. gingivalis*-Stämmen. Hierbei lag die Invasionsrate stammabhängig zwischen 11,6 % und 26,4 %. Auch in Gingivafibroblasten konnte eine Internalisierung des in der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Forschung verwendeten Stammes *P. gingivalis* W83 dokumentiert werden (Irshad *et al.* 2012). Die Invasionsrate betrug etwa 0,007 %.

Han *et al.* (2000) untersuchten Adhärenz und Internalisierung an hGEC und KB-Zellen. Neben *P. gingivalis* wurden diese Virulenz-Mechanismen hier für *F. nucleatum* beobachtet. Dabei lag die Adhärenz von *F. nucleatum* 12230 bei 8,16 %, die Internalisierungsrate betrug 2,88 %. Für KB-Zellen wurden in der gleichen Studie Adhärenzwerte für *F. nucleatum* bis 17,7 % und Internalisierungswerte bis 4,5 % ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte, unter strikt anaeroben Versuchsbedingungen, dokumentiert werden, dass die Spezies *F. nucleatum* und *P. gingivalis* in unterschiedlichem Maße sowohl an hDFSC als auch an hBMSC adhärieren und auch in diese internalisieren. Um einen direkten Vergleich bezüglich der Stärke dieser Interaktionen zu erhalten, wurden ebenfalls die höher differenzierten oralen Zelllinien (verschiedener Keimblätter) hGiF und Ca9-22 untersucht. Es wurde für alle Zellen das gleiche anaerobe experimentelle Setup verwendet. Dabei erwies sich das Adhärenzpotential von *F. nucleatum* ATCC 23726 und *P. gingivalis* W50 an den Ca9-22-Zellen als signifikant höher gegenüber den für die hDFSC gemessenen Werten. In den *F. nucleatum*-ATCC-25586- und *P. gingivalis*-W83-Ko-Kulturen waren die



Adhärenzwerte zwar auch für Ca9-22 am höchsten, jedoch lagen keine statistisch signifikanten Unterschiede zu den hDFSC vor. An den hBMSC wurden in jeder Ko-Kultur verglichen mit hGiF und Ca9-22 statistisch signifikant weniger anhaftende Mikroorganismen detektiert. Zwischen hGiF und hDFSC waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

In unseren Untersuchungen fielen die Internalisierungsraten von *F. nucleatum* ATCC 23726 und ATCC 25586 an den hDFSC signifikant niedriger aus als an den höher differenzierten Zelllinien hGiF und Ca9-22. Bei beiden *P. gingivalis*-Stämmen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zellarten und es wurde generell nur eine sehr schwache Internalisierung der Bakterien, wie bereits von Irshad *et al.* (2012) beschrieben, beobachtet.

Im Hinblick auf die Werte aus bereits durchgeführten Studien lässt sich bei diesen eine große Inhomogenität der durch verschiedene Arbeitsgruppen erhobenen Adhärenz- und Internalisierungsdaten erkennen, obgleich bei fast allen Untersuchungen mit einer MOI von 100 und einer mehr oder weniger modifizierten Form des „antibiotic-protection-assay“ nach Lamont *et al.* (1995) gearbeitet wurde. Für die Adhärenz von *P. gingivalis* W50 und W83 an hGiF ergaben sich in der Studie von Watanabe *et al.* (1992) ähnliche Werte wie in der vorliegenden Arbeit (W50 1,4 %, W83 0,9 %). Auch konnten in der vorliegenden Untersuchung im Einklang mit der Studie von Han *et al.* (2000) für verschiedene *F. nucleatum*-Spezies unabhängig von der Zelllinie höhere Adhärenz- und Internalisierungswerte gemessen werden als für *P. gingivalis*.

Trotz des Unterschiedes, dass mit dem hier verwendeten Ko-Kultur-Modell, im Gegensatz zu allen bisherigen Studien, unter anaeroben Bedingungen gearbeitet wurde, ließen sich dennoch insgesamt ähnliche Werte wie in den Untersuchungen von Watanabe *et al.* (1992), Duncan *et al.* (1993) und Irshad *et al.* (2012) ermitteln. Entsprechend der Hypothese zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede in der Anfälligkeit für bakterielle Adhärenz und Internalisierung zwischen den Stammzellen und den höher differenzierten Zellen.

Auch Huard-Delcourt *et al.* (1998b) verglichen verschiedene Zelllinien (hGEC und KB) hinsichtlich des Adhärenzvermögens von *P. gingivalis*. Sie führten die in ihrer Studie gefundenen Unterschiede im Adhärenzpotential auf unterschiedlich stark exprimierte Oberflächenrezeptoren zurück. Es konnte mittels durchflusszytometrischer Analysen gezeigt werden, dass KB-Zellen für *P. gingivalis* weniger Rezeptoren aufweisen als primäre gingivale Epithelzellen. Um welche Rezeptoren es sich handelt, geht nicht aus der Studie hervor.

Jedoch wurde festgestellt, dass ein Sättigungsplateau bei den jeweiligen Zellen erreicht wird, wenn alle Bindestellen belegt sind. Möglicherweise spielen bei den zellspezifischen Oberflächenrezeptoren PRRs und hier im Besonderen TLR2 und TLR4 eine Rolle.

Tomic *et al.* (2011) beschrieben erstmals die Expression von TLR4 auf hDFSC. Die Autoren stellten fest, dass im Vergleich zwischen humanen Dental Pulp Stem Cells (hDPSC) und hDFSC Letztere eine deutlich geringere TLR4-Expression aufwiesen. Auch für hBMSC ist eine TLR4-Expression beschrieben worden (Liotta *et al.* 2008; Peyret-Lacombe *et al.* 2009; Krasnodembskaya *et al.* 2010). Über TLRs werden von den Zellen eindringende Pathogene wahrgenommen. TLR4 bindet mit seinem Co-Rezeptor CD14 das LPS Gram-negativer Bakterien (Dabija-Wolter *et al.* 2009). Eine unterschiedlich stark ausgeprägte TLR-Expression auf den beiden Stammzellarten sowie den beiden terminal differenzierten Zelllinien könnte eine abgestufte Stärke des Adhärenz- und Internalisierungsvermögens der Keime erklären. Diese Theorie wurde auch von Dabija-Wolter *et al.* (2009) in ihrer Studie diskutiert. Sie führten die geringere Adhärenz von *F. nucleatum* an den untersuchten Fibroblasten des parodontalen Ligamentes (verglichen mit Fibroblasten der Gingiva) auf ein geringeres Vorkommen von TLR2 und TLR4 auf diesen Zellen zurück.

Die Annahme, dass Stammzellen weniger TLRs exprimieren, würde mit der These von Kusumoto *et al.* (2004) übereinstimmen. Es wird davon ausgegangen, dass es eine Abhängigkeit zwischen der Menge an TLRs und dem Differenzierungsgrad der Zellen geben könnte. In ihrer Arbeit konnten sie zeigen, dass die TLR-Expression auf den Zellen der oralen Lamina Epithelialis Mucosae nicht einheitlich ist. Die Vorläuferzellen in der Basalmembran weisen eine geringere TLR-Dichte auf als die ausdifferenzierten Zellen des Stratum Spinosum. Für dendritische Zellen ist eine Korrelation der Höhe der TLR-Expression mit dem Stadium der Differenzierung bereits nachgewiesen worden. Kadowaki *et al.* (2001) zeigten, dass DC-Progenitoren weniger TLRs exprimieren als ausgereifte DCs.

Ein weiterer Erklärungsansatz bezüglich der unterschiedlichen Adhärenz- und Internalisierungswerte bezieht sich auf eine mögliche direkte antimikrobielle Wirkung der Stammzellen in den Ko-Kulturen. Krasnodembskaya *et al.* (2010) beobachteten in ihrer *in-vitro*-Studie einen direkten antibakteriellen Effekt von hBMSC. Sie beschrieben eine Wachstumshemmung von *E. coli*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* durch die Sekretion von humanem cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP /LL-37). Mittels eines monoklonalen Blocking-Antikörpers gegen LL-37 konnte die Wachstumshemmung wieder aufgehoben werden. Somit konnte in dieser Studie den hBMSC eine tatsächliche direkte antimikrobielle

Wirkung zugeschrieben werden. Durch Meisel *et al.* (2011) wurde gezeigt, dass durch Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) -Expression von hBMSC Bakterienwachstum direkt gehemmt und Immunantworten herunter reguliert werden können. Als Enzym hemmt IDO bakterielle Vermehrung, indem die zur Proteinsynthese notwendige Aminosäure Tryptophan abgebaut wird (Müller *et al.* 2009). Dass auch dentale Stammzellen IDO exprimieren, zeigten Tomic *et al.* (2011) für DFSC und DPSC.

Bei den morphologischen Untersuchungen (Fluoreszenzmikroskopie und REM) der anaeroben Ko-Kultur der hDFSC und hBMSC mit *F. nucleatum* und *P. gingivalis* nach Lebend/Tot-Färbung konnte das Überleben der Bakterien und Zellen in der Ko-Kultur sowie das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der Keime an den hDFSC und hBMSC dargestellt werden. Es waren unterschiedliche Adhärenzmuster der Keime an den Zellen zu beobachten. Es stellte sich heraus, dass in den *F. nucleatum*-Ko-Kulturen mehr vitale humane Zellen zu finden waren und die pathogenen Spezies eine höhere Affinität zu den Zellen aufwiesen. Hingegen waren in den *P. gingivalis*-Ko-Kulturen vermehrt tote humane Zellen vorzufinden. Die Bakterien waren um die Zellen herum verteilt sichtbar. Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der Adhärenz- und Internalisierungsuntersuchungen für die hDFSC und hBMSC. Das vorgefundene Verteilungsmuster der *P. gingivalis*-Spezies ist ebenfalls durch Cook (1998) in Biofilm-Untersuchungen beobachtet worden. Für die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten *P. gingivalis*-Stämme W50 und W83 ist aus der Studie von Watanabe *et al.* (1992) bekannt, dass sie kein ausgeprägtes Adhärenzverhalten zeigen. Sie führen dieses relativ niedrige Adhärenzpotential auf ein Fehlen bestimmter Fimbrienarten, welche die Bakterien zur Adhärenz benötigen, zurück. Zudem konnten sie in ihrer vergleichenden Studie zwischen den verschiedenen, mehr oder weniger adhärenenten *P. gingivalis*-Subspezies unterschiedliche Oberflächeneigenschaften feststellen. Die Spezies, welche eine hohe Zell-Adhäsions-Aktivität aufwiesen, waren eher hydrophob, wohingegen sich die Bakterien, welche kein ausgeprägtes Adhärenzverhalten zeigten, als relativ hydrophil darstellten. Diese verschiedenartige Oberflächenbeschaffenheit der Keime könnte das vorgefundene Verteilungsmuster unterstützt haben.

Auch die Möglichkeit der Sekretion antimikrobieller Substanzen wie LL-37 oder IDO durch die Zellen könnte zu der reduzierten Menge vorgefundener *P. gingivalis* geführt haben. Ebenso ist das Fehlen *in vivo* vorkommender Brückenspezies, welche *P. gingivalis* eine Adhärenz an und eine Invasion in Zellen erleichtern, ein möglicher, in diesem Kontext zu berücksichtigender Faktor (Kinder und Holt 1993; Saito *et al.* 2012). Die Ko-Infektion von *P.*

*gingivalis* W83 mit verschiedenen *F. nucleatum*-Stämmen verstärkt die Zellinvasion von *P. gingivalis* um das 2- bis 20-Fache (Saito et al. 2008). Die erhöhte Effizienz der *P. gingivalis*-Internalisierung wird dabei auf synergistische Effekte der Bi-Spezies-Infektion hinsichtlich der Beeinflussung und Veränderung der Zellen zurückgeführt.

#### 4.2.2 Zytokinantwort (IL-8-Sekretion)

Als Antwort auf eindringende Pathogene reagieren lokale Gewebszellen mit der Freisetzung proinflammatorischer chemotaktischer Mediatoren (Zhang et al. 1999; Han et al. 2000). In der Folge werden Abwehrzellen rekrutiert und die Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe aktiviert. Stammzellen nehmen in diesem Kontext eine besondere Stellung ein. Für dentale Stammzellen konnte eine neutrale bis antiinflammatorisch balancierte Aktivität bei entzündlichen Prozessen beobachtet werden (Tomic et al. 2011; Prockop und Oh 2011; Wada et al. 2009; Morsczeck et al. 2012). Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit Erkenntnisse zur zellulären Zytokinantwort von hDFSC nach direkter Ko-Kultur mit parodontopathogenen Bakterien unter anaeroben Bedingungen als immunologische Reaktion auf pathogenassoziierte Stimulation gewonnen werden.

Für verschiedene orale Zelllinien wurde sowohl mit *P. gingivalis*-LPS allein als auch nach Ko-Kultur mit *P. gingivalis* oder *F. nucleatum* eine gesteigerte proinflammatorische Zytokinexpression und -sekretion gemessen (Kusumoto et al. 2004; Stathopoulou et al. 2010). Durch LPS oder direkten bakteriellen Kontakt mit Wirtszellen wird über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges die Synthese und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 bewirkt (Chow et al. 1999). IL-8 führt unter anderem zur chemotaktischen Rekrutierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten in das Entzündungsgebiet, wodurch diesem Transmitter auch in der Pathogenese der Parodontitis eine entscheidende Rolle zukommt (Bickel et al. 1993; Okada und Murakami 1998). Stathopoulou et al. (2010) zeigten, dass es bei hGEC nach *F. nucleatum*-Infektion in Abhängigkeit der Infektionsdauer zu einer Zunahme der IL-1 $\beta$ -, IL-6- und IL-8-Sekretion kommt. Ebenso wurde durch *P. gingivalis*-LPS eine erhöhte IL-8-Sekretion in hGEC beobachtet (Kusumoto et al. 2004).

Für dentale Stammzellen wurde bezüglich des Einflusses von LPS gezeigt, dass in hDPSC (Dentale Pulp Stem Cells) unter anderem der NF $\kappa$ -B-Signalweg aktiviert wird (Chang et al. 2005). In SCAP (Stem Cells of the Apical Papilla) und hDFSC konnte durch LPS-Zugabe eine Steigerung der Expression verschiedener Zytokine und Chemokine nachgewiesen werden

(Zhang *et al.* 2013; Morsczeck *et al.* 2012). Hingegen löste bei dentalen Stammzellen aus dem Zahnfollikel (hDFSC) in den Untersuchungen von Tomic *et al.* (2011) und Chatzivassileiou *et al.* (2013) die Stimulation mit LPS nur eine sehr geringe bis gar keine proinflammatorische Zytokinsekretion aus. Ähnliche Beobachtungen machten Morsczeck *et al.* (2012). Auch in dieser Studie reagierten hDFSC auf *P. gingivalis*-LPS nicht mit der für beispielsweise PDL-Zellen bekannten proinflammatorischen Zytokinantwort, das heißt, es kam lediglich zu einer leicht erhöhten IL-8-Expression.

In der vorliegenden Arbeit wurde die IL-8-Sekretion von hDFSC nach direkter Ko-Kultur mit vitalen *P. gingivalis*- oder *F. nucleatum*-Spezies erstmalig im anaeroben Milieu untersucht. Die sezernierten Zytokine aus den Überständen wurden nach 1, 2, 4 und 24 h gemessen. Es zeigte sich sowohl nach hDFSC-*F.nucleatum*- sowie hDFSC-*P.gingivalis*-Ko-Kultur gegenüber der Negativkontrolle auch hier nur eine geringe Zunahme der IL-8-Sekretion. Jedoch wurde in allen hDFSC-Ko-Kulturen im Vergleich mit den höher differenzierten Zelllinien hGiF und Ca9-22 statistisch signifikant weniger IL-8 nachgewiesen. Generell löste die Infektion mit *F. nucleatum* bei allen Zelllinien eine stärkere proinflammatorische Zytokinantwort aus als die Infektion mit *P. gingivalis*.

Die Werte des ELISA-Testes korrelierten weitestgehend mit der Infektionsdauer sowie dem Adhärenz- und Internalisierungspotential der Keime an den Zellen. Den direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des Bakterien-Zellkontaktes und der daraus resultierenden Zytokinantwort als Reaktion der Zelle zeigten bereits Sandros (2000) und Han (2000). Diese Relation konnte, mit Ausnahme von *P. gingivalis* W50, mit den hier vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Möglicherweise sind die geringen Mengen IL-8 in der *P. gingivalis*-W50-Ko-Kultur auf die Aktivität Zytokin-degradierender Cystein-Proteasen, welche durch einige Vertreter dieser Spezies produziert werden (Zhang *et al.* 1999; Darveau *et al.* 1998), zurückzuführen.

Morsczeck *et al.* (2012) geben bezüglich der ebenfalls beobachteten geringen proinflammatorischen Zytokinexpression der hDFSC nach Kontakt mit bakteriellen Stimuli zu bedenken, dass hDFSC als Teil des Zahnkeimes für gewöhnlich zeitlebens nicht mit Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen in Kontakt kommen. Es wäre denkbar, dass es weder ihre Aufgabe ist, im Gewebe am Entzündungsprozess aktiv teilzunehmen, noch sind sie funktionell, beispielsweise mit entsprechenden PRRs, dafür ausgestattet. Sie vergleichen in ihren Untersuchungen hDFSC mit PDL-Zellen und stellen fest, dass PDL-Zellen nach bakteriellem Kontakt im Rahmen einer Parodontitis als Immunzellen tätig werden können.

Diese Fähigkeit könnte nach Morsczeck *et al.* (2012) auch für hDPSC zutreffen. Bei den pulpalen Stammzellen wurde nach Behandlung mit *P. gingivalis*-LPS, im Gegensatz zu hDFSC, eine IL-6- und IL-8-Induktion beobachtet (Chang *et al.* 2005). Eine Erklärung für die geringe Zytokinsekretion durch die hDFSC ist, dass diese Progenitoren deutlich weniger TLR4 auf der Oberfläche exprimieren als hDPSC (Tomic *et al.* 2011). Folglich kommt es zu einer schwächeren Immunantwort der hDFSC. Überdies wurde beobachtet, dass die Stimulation mit *P. gingivalis*-LPS nicht zu einer Steigerung in der TLR4-Expression führt (Chatzivasileiou *et al.* 2013). Somit scheinen hDFSC nicht so stark wie andere Zellen, bei denen eine erhöhte TLR-Expression nach LPS-Kontakt bekannt ist, von diesem bakteriellen Virulenzfaktor beeinflusst zu sein.

Die Beobachtungen aus bisherigen Studien zum neutralen bis antiinflammatorischen Verhalten humaner dentaler Follikel-Stammzellen (Tomic *et al.* 2011) können durch die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit bestätigt werden und haben somit auch unter den hier gewählten physiologischen (anaeroben) Versuchsbedingungen Gültigkeit.

## **Zusammenfassung**

Die Annahme, dass parodontale Regeneration im Wesentlichen eine Wiederholung des Entwicklungsprozesses einschließlich Morphogenese, Zytodifferenzierung, extrazellulärer Matrixproduktion und Mineralisierung ist, spiegelt die Bedeutung des Vorhandenseins von lokalen Stammzellen im Gewebe als Quelle für die Bildung neuer Zementoblasten, Osteoblasten und Fibroblasten wider (Bartold *et al.* 2006). Erstaunlicherweise finden diese regenerativen Prozesse trotz permanenter bakterieller Belastung fortwährend statt.

Neueren Untersuchungen zur Folge sind es vornehmlich immunologische Aspekte, durch welche die Aktivität lokaler Stammzellen in entzündlichen und regenerativen Prozessen gekennzeichnet ist (Wada *et al.* 2013; Tomic *et al.* 2011; Wada *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2013).

Vor allem hochvirulente Keime, wie sie oftmals im Rahmen einer Parodontitis vorhanden sind, stellen für die Zellen der parodontalen Gewebe eine Herausforderung dar. Diese pathogenen Mikroorganismen können, aus dem Biofilmverband herausgelöst, in tiefere Gewebsschichten eindringen und dort direkt mit den Zellen interagieren. Zum Verhalten von Progenitorzellen in Bezug auf Interaktionen mit pathogenen Keimen gibt es bisher wenige, meist auf die Wirkung bakterieller Bestandteile beschränkte Untersuchungen. Bestehende Studien zeigen aber die Tendenz, dass eine bakterielle Stimulation bei humanen dentalen Follikel-Stammzellen (hDFSC) eine weniger starke proinflammatorische Reaktion hervorruft, als es für ausdifferenzierte Gewebszellen bekannt ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte der direkte Einfluss von oralen Mikroorganismen auf dentale Stammzellen untersucht und Unterschiede zu weiteren Zelllinien in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades analysiert werden. Die Problematik bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen parodontopathogenen Bakterien und humanen Zellen liegt in dem Umstand begründet, dass einige wichtige Spezies in Abhängigkeit obligat anaerober Lebensbedingungen existieren. Humane Zellen hingegen benötigen Sauerstoff für ihren Metabolismus. Diesem Umstand wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Etablierung eines anaeroben Bakterien-Zell-Ko-Kultur-Modelles Rechnung getragen. Es zeigte sich in den Untersuchungen, dass dentale Follikel-Stammzellen, Knochenmarksstammzellen (hBMSC), gingivale Fibroblasten (hGiF) sowie gingivale Epithelzellen (Ca9-22) bis zu 72 h unter anaeroben Bedingungen überleben können. Zu allen Zeitpunkten wurde bei den dentalen Follikel-Stammzellen eine signifikant höhere Überlebensrate gegenüber den gingivalen

Epithelzellen sowie den Gingivafibroblasten beobachtet. Zudem zeigten hBMSC eine ähnlich hohe Toleranz gegenüber anaeroben Bedingungen wie hDFSC. Bei einer Inkubation länger als 72 h nahm die Überlebensrate bei allen vier Zellarten stark ab. Dieses stellte sich jedoch nicht als versuchslimitierend heraus, da sich die Beobachtungszeiträume der nachfolgenden Versuche auf maximal 24 h beschränkten. Die Anzahl vitaler Zellen blieb in diesem Versuchszeitraum konstant. Das hier vorgestellte Versuchsmodell ist gut auf zukünftige Studien zu Interaktionen von Anaerobiern mit Zellen übertragbar. Anschließend konnten mit dem etablierten Setup die Untersuchungen zu direkten Wechselwirkungen von parodontopathogenen Bakterien mit humanen Zellen durchgeführt werden.

Es wurden für die Experimente die beiden Gram-negativen Spezies *F. nucleatum* und *P. gingivalis* ausgewählt. Sie gelten als Markerkeime in der Pathogenese der Parodontitis und sind bezüglich ihrer Interaktionen mit verschiedenen Zelllinien gut untersucht (Han *et al.* 2000). Des Weiteren wurden als Vertreter der dentalen Stammzellen hDFSC aus dem Zahnfollikel isoliert, kultiviert und charakterisiert. Durch FACS-Analysen sowie multilineare Differenzierung konnte der Stammzellcharakter der gewonnenen Zellen bestätigt werden. Als Untersuchungsparameter möglicher Interaktionen interessierte als Erstes die Anfälligkeit der dentalen Stammzellen für bakterielle Adhärenz und Internalisierung. Vor dem Hintergrund, dass Progenitoren möglicherweise weniger stark auf bakterielle Stimulation reagieren, wurde zur Charakterisierung des immunologischen Verhaltens nach direkter Bakterien-Zell-Ko-Kultur der Einfluss auf die IL-8-Sekretion untersucht.

Die Ergebnisse der Adhärenz- und Internalisierungsuntersuchung zeigten, dass dentale Stammzellen eine geringere Anfälligkeit für bakterielle Anheftung und Invasion aufweisen als höher differenzierte Zellarten. Auf dieser Ebene konnte in der vorliegenden Arbeit in der *in-vitro*-Ko-Kultur eine schwächere Interaktion von pathogenen Mikroorganismen mit Stammzellen dentalen Ursprungs im Vergleich zu höher differenzierten Zellen gezeigt und die postulierte Hypothese bestätigt werden.

Des Weiteren wurden zur Visualisierung der Interaktionen morphologische Untersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und REM durchgeführt. Dabei konnten unterschiedliche Adhärenzmuster der Bakterien gezeigt werden, was auch die Ergebnisse der Adhärenzuntersuchungen an den Stammzellen widerspiegeln.

Bezüglich des immunologischen Verhaltens von dentalen Stammzellen nach bakterieller Infektion zeigte die anschließende Untersuchung der Zytokin-Sekretion signifikante



Unterschiede zu den höher differenzierten Zellen. Die Zytokin-Messung in den Überständen der Ko-Kulturen ergab, dass hDFSC nach Infektion mit *P. gingivalis* oder *F. nucleatum* eine signifikant geringere IL-8-Sekretion aufweisen als hGiF und Ca9-22. Auch hier wurden kaum Unterschiede zwischen dentalen und Knochenmarksstammzellen festgestellt. Somit bestätigen diese Beobachtungen ebenfalls die Hypothese der Arbeit. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit vorliegenden Studien, in denen Stammzellen dentalen Ursprungs schwächer auf bakterielle Stimulation reagieren und in einem entzündlichen Geschehen weniger immunologisch aktiv werden als höher differenzierte Zellen (Morsczeck *et al.* 2012; Chatzivasileiou *et al.* 2013; Tomic *et al.* 2011). Zusammenfassend stimmen die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit mit der Tatsache überein, dass dentale Stammzellen physiologisch zunächst für regenerative Prozesse und Wundheilung und nicht für immunologische Aufgaben und Wirtsabwehr zuständig sind. Im entzündlich veränderten Gewebe werden sie wahrscheinlich weniger von einer bakteriellen Infektion beeinflusst als gewebständige Zellen eines höheren Differenzierungsgrades.

## Ausblick

Seit ihrer Entdeckung werden dentale Progenitorzellen mit Stammzeleigenschaften als therapeutisches Tool für die zellgestützte Geweberegeneration diskutiert (Melcher 1985). Gerade ihre verhältnismäßig unkomplizierte Verfügbarkeit macht sie, nicht nur für den dentalen Anwendungsbereich, so attraktiv (Morsczeck *et al.* 2008; Estrela *et al.* 2011). Wie sich eine bakterielle Infektion auf das Verhalten von lokalen oder therapeutisch applizierten dentalen Follikel-Stammzellen auswirkt, ist ein bisher wenig beachteter Aspekt der regenerativen Medizin. Durch die vorliegende Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die Biologie und das Verhalten von hDFSC in direkter Ko-Kultur mit parodontopathogenen Bakterien gewonnen werden.

Die Ergebnisse geben Anlass zur Annahme, dass ein sicherer Einsatz dentaler Stammzellen auch in bakteriell belasteten Geweben denkbar ist und einen positiven Einfluss auf entzündliche Prozesse sowie die Geweberegeneration hat.

Weiterführende *in-vitro*-Untersuchungen, vor allem zum Einfluss der Pathogene auf das Differenzierungs- und Expansionsverhalten von dentalen Stammzellen, wären sinnvoll. Zudem wäre die Untersuchung zusätzlicher immunologischer Parameter, wie der Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren und der direkte Einfluss der TLRs, eine mögliche Weiterentwicklung der Studie.

## Thesen

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen werden folgende Thesen abgeleitet:

- (1) Bei der Kultivierung unter strikt anaeroben Bedingungen zeigen dentale Follikel- und Knochenmarksstammzellen eine größere Überlebensrate als höher differenzierte Zellen.
- (2) Es finden auf verschiedenen Ebenen Interaktionen zwischen dentalen Stammzellen und parodontopathogenen Keimen in einer Ko-Kultur statt.
- (3) Dentale Stammzellen sind weniger anfällig für Adhärenz und Internalisierung der pathogenen Bakterienspezies *P. gingivalis* und *F. nucleatum* als die höher differenzierten Zellen des gingivalen Bindegewebes und des Gingivaepithels.
- (4) Nach Ko-Inkubation mit parodontopathogenen Anaerobiern sind dentale Stammzellen immunologisch weniger aktiv als die höher differenzierten Zellen des gingivalen Bindegewebes und des Gingivaepithels.
- (5) Stammzellen unterschiedlicher Herkunft (hDFSC, hBMSC) weisen bei anaerober Ko-Kultur mit parodontopathogenen Mikroorganismen große Ähnlichkeiten in ihrem Verhalten auf.

## Literaturverzeichnis

- Amano, A. (2003): Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *Journal of periodontology* 74:90-96.
- Amornchat, C.; Rassameemasmaung, S.; Sripairojthikoon, W.; Swasdison, S. (2003): Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into human gingival fibroblasts *in vitro*. *Journal of the International Academy of Periodontology* 5:98.
- Andrian, E.; Grenier, D.; Rouabhia, M. (2006): *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *Journal of dental research* 85:S. 392.
- Aranha, A.; Zhang, Z.; Neiva, K.; Costa, C.; Hebling, J.; Nör, J. (2010): Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* 36: 1633–1637.
- Auletta, J.J.; Deans, R.J.; Bartholomew, A.M (2012): Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. *Blood* 119:1801-1809.
- Avila-Campos, M.; Sacchi, C.; Whitney, A.; Steigerwalt, A.; Mayer, L. (1999): Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction for Identification and Epidemiologic Subtyping of Oral Isolates of *Fusobacterium nucleatum*. *Journal of periodontology* 70:1202–1208.
- Babu, J.; Dean, J.; Pabst, M. (1995): Attachment of *Fusobacterium nucleatum* to fibronectin immobilized on gingival epithelial cells or glass coverslips. *Journal of periodontology* 66:285–290.
- Bartold, P.; Shi, S.; Gronthos, S. (2006): Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology* 2000 40:164-172.
- Beck, J.; Offenbacher, S.; Williams, R.; Gibbs, P.; Garcia, R. (1998): Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease? *Annals of periodontology* 3:127–141.
- Belton, C.; Izutsu, K.; Goodwin, P.; Park, Y.; Lamont, R. (2001): Fluorescence image analysis of the association between *Porphyromonas gingivalis* and gingival epithelial cells. *Cellular Microbiology* 1:215-223.
- Bianco, P.; Robey, P.; Simmons, P. (2008): Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell stem cell* 2:313–319.
- Bickel, M.; others (1993): The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of periodontology* 64 (5 Suppl), 456.
- Blanpain, C.; Lowry, W.; Geoghegan, A.; Polak, L.; Fuchs, E. (2004): Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118:635–648.
- Bolstad, A.; Jensen, H.; Bakken, V. (1996): Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews* 9:55–71.
- Boman, H.G (2000): Innate immunity and the normal microflora. *Immunological reviews* 173:5–16.

- Brook, I.; Walker, R. (1986): The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. *Journal of medical microbiology* 21 (2), S. 93–100.
- Caplan, A. (1991): Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research* 9:641–650.
- Casadevall, A.; Pirofski, L. (2000): Host-pathogen interactions: Basic concepts of microbial commensalism, colonization, infection, and disease. *Infection and immunity* 68:6511–6518.
- Chang, J.; Zhang, C.; Tani-Ishii, N.; Shi, S.; Wang, C. (2005): NF- $\kappa$ B activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *Journal of dental research* 84: 994–998.
- Chatzivasileiou, K.; Lux, C.; Steinhoff, G.; Lang, H. (2013): Dental follicle progenitor cells responses to *Porphyromonas gingivalis* LPS. *Journal of cellular and molecular medicine*.
- Chow, J.; Young, D.; Golenbock, D.; Christ, W.; Gusovsky, F. (1999): Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 274:10689–10692.
- Cook, G.; Costerton, J.; Lamont, R. (1998). Biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of Periodontal Research* 33:323–327.
- Dabija-Wolter, D.; Cimpan, M.; Costea, D.; Johannessen, A.; Sørnes, S.; Neppelberg, E. (2009): *Fusobacterium nucleatum* enters normal human oral fibroblasts *in vitro*. *Journal of periodontology* 80:1174–1183.
- Darenfed, H.; Grenier, D.; Mayrand, D. (1999): Acquisition of plasmin activity by *Fusobacterium nucleatum* subsp, *nucleatum* and potential contribution to tissue destruction during periodontitis. *Infection and immunity* 67:6439–6444.
- Darveau, R.; Belton, C.; Reife, R.; Lamont, R.. (1998): Local Chemokine Paralysis, a Novel Pathogenic Mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity* 66: 1660–1665.
- DeStefano, F.; Anda, R.; Kahn, H. S.; Williamson, D.; Russell, C. (1993): Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ: British Medical Journal* 306:688.
- Diaz, P.; Rogers, A. (2004): The effect of oxygen on the growth and physiology of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology* 19:88–94.
- Diaz, P.; Zilm, P.; Rogers, A. (2002): *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology* 148:467.
- Ding, G.; Liu, Y.; Wang, W.; Wei, F.; Liu, D.; Fan, Z. *et al.* (2010): Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem cells* 28:1829–1838.
- Dixon, D.; Reife, R.; Cebra, J.; Darveau, R. (2004): Commensal bacteria influence innate status within gingival tissues: A pilot study. *Journal of periodontology* 75:1486–1492.
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D. *et al.* (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.

- Dos Santos, F.; Andrade, P.; Boura, J.; Abecasis, M.; da Silva, C.; Cabral, J. (2010): Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *Journal of cellular physiology* 223:27–35.
- Duncan, M.; Nakao, S.; Skobe, Z.; Xie, H. (1993): Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infection and immunity* 61:2260–2265.
- Dzink, J.; Socransky, S.; Haffeejee, A. (1988): The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 15:316–323.
- Estrela, C.; Alencar, A.; Kitten, G.; Vencio, E.; Gava, E. (2011): Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal* 22:91-98.
- Feng, F.; Akiyama, K.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Wang, T.; Chen, J. *et al.* (2010): Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral diseases* 16:20-28.
- Feng, Z.; Weinberg, A. (2006): Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000 40:50–76.
- Feuille, F.; Kesavalu, L.; Steffen, M.; Holt, S.; Ebersole, J. (1994): Synergistic tissue destruction induced by *P. gingivalis* and *F. nucleatum*. *Journal of Dental Research* 73:159.
- Finlay, B.; Cossart, P. (1997): Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276:718–725.
- Fredette, V.; Plante, C.; Roy, A. (1967): Numerical data concerning the sensitivity of anaerobic bacteria to oxygen. *Journal of bacteriology* 94:2012–2017.
- Friedenstein, A.; Petrakova, K.; Kurolesova, A.; Frolova, G. (1968): Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6:230–247.
- Gaebel, R.; Ma, N.; Liu, J.; Guan, J.; Koch, L.; Klopsch, C. *et al.* (2011): Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Biomaterials* 32:9218–9230.
- Gängler, P.; Arnold, W. (2005): Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie: 66 Tabellen: Georg Thieme Verlag (4).
- Gonzalez-Rey, E.; Anderson, P.; González, M.; Rico, L.; Büscher, D.; Delgado, M. (2009): Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58:929–939.
- Grayson, W.; Zhao, F.; Izadpanah, R.; Bunnell, B.; Ma, T. (2006): Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *Journal of cellular physiology* 207:331–339.
- Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahimi, J.; Robey, P.; Shi, S. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13625–13630.
- Haddouti, E.; Skroch, M.; Zippel, N.; Müller, C.; Birova, B.; Pansky, A. *et al.* (2009): Human dental follicle precursor cells of wisdom teeth: isolation and differentiation towards

- osteoblasts for implants with and without scaffolds. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 40:732–737.
- Han, Y.; Shi, W.; Huang, G.; Kinder Haake, S.; Park, N.; Kuramitsu, H.; Genco, R. (2000): Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infection and immunity* 68:3140–3146.
- Handfield, M.; Mans, J.; Zheng, G.; Lopez, M.; Mao, S.; Progulske-Fox, A. *et al.* (2005): Distinct transcriptional profiles characterize oral epithelium-microbiota interactions. *Cellular Microbiology* 7:811–823.
- Hasegawa, Y.; Mans, J.; Mao, S.; Lopez, M.; Baker, H.; Handfield, M.; Lamont, R. (2007): Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *In Infection and immunity* 75: 2540–2547.
- Hausmann, E.; Raisz, L.; Miller, W. (1970): Endotoxin: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 168:862–864.
- He, W.; Wang, Z.; Zhou, Z.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Wei, K. *et al.* (2014): Lipopolysaccharide Enhances Wnt5a Expression through Toll-like Receptor 4, Myeloid Differentiating Factor 88, Phosphatidylinositol 3-OH Kinase/AKT and Nuclear Factor Kappa B Pathways in Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics* 40:69–75
- Hirose, K.; Isogai, E.; Mizugai, H.; Ueda, I. (1996): Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca9-22. *Oral microbiology and immunology* 11:402–406.
- Holt, S.; Kesavalu, L.; Walker, S.; Genco, C. (1999): Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000* 20:168-238.
- Hooper, L.; Gordon, J. (2001): Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115–1118.
- Hooper, L.; Wong, M.; Thelin, A.; Hansson, L.; Falk, P.; Gordon, J. (2001): Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 291:881–884.
- Horikoshi, M.; Kimura, Y.; Nagura, H.; Ono, T.; Ito, H. (1974): A new human cell line derived from human carcinoma of the gingiva. I. Its establishment and morphological studies. *Nippon Koku Geka Gakkai zasshi* 20:100–106.
- Huard-Delcourt, A.; Du, L.; Pellen-Mussi, P.; Tricot-Doleux, S.; Bonnaure-Mallet, M. (1998a): Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells, analysis by flow cytometry. *European journal of oral sciences* 106: 938-944.
- Huard-Delcourt, A.; Du, L.; Pellen-Mussi, P.; Tricot-Doleux, S.; Bonnaure-Mallet, M. (1998b): Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells, analysis by flow cytometry. *European journal of oral sciences* 106:938-944.
- Hübner, K.; Fuhrmann, G.; Christenson, L.K; Kehler, J.; Reinbold, R.; La Fuente, R. de *et al.* (2003): Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300:1251–1256.

- Irshad, M.; van der Reijden, W.; Crielaard, W.; Laine, M. (2012): In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; Role of the capsule. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 60:469–476.
- Ismail, A.; Hooper, L. (2005): Epithelial cells and their neighbors. IV. Bacterial contributions to intestinal epithelial barrier integrity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 289:779–784.
- Kadowaki, N.; Ho, S.; Antonenko, S.; Waal Malefyt, R. de; Kastelein, R.; Bazan, F. *et al.* (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine* 194:863–870.
- Karring, T.; Nyman, S.; Gottlow, J. A.N.; Laurell, L. (1993): Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies. *Periodontology* 2000 1:26–35.
- Kinane, D.; Attström, R. (2005): Advances in the pathogenesis of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 32:130–131.
- Kinder, S.; Holt, S. (1993): Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with *Porphyromonas gingivalis* T22. *Journal of bacteriology* 175:840–850.
- Koch, A.; Polverini, P.; Kunkel, S.; Harlow, L.; DiPietro, L.; Elner, V. *et al.* (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258:1798–1801.
- Kolenbrander, P.; Palmer Jr., R.; Rickard, A.; Jakubovics, N.; Chalmers, N.; Diaz, P. (2006): Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000 42:47–79.
- Könönen, E. (2000): Development of oral bacterial flora in young children. *Annals of Medicine* 32: 107–112.
- Krasnodembskaya, A.; Song, Y.; Fang, X.; Gupta, N.; Serikov, V.; Lee, J.; Matthay, M. (2010): Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem cells* 28:2229–2238.
- Kriebel, K.; Biedermann, A.; Kreikemeyer, B.; Lang, H. (2013): Anaerobic Co-Culture of Mesenchymal Stem Cells and Anaerobic Pathogens-A New *In Vitro* Model System. *PLoS One* 8:e78226.
- Kusumoto, Y.; Hirano, H.; Saitoh, K.; Yamada, S.; Takedachi, M.; Nozaki, T. *et al.* (2004): Human gingival epithelial cells produce chemotactic factors interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 after stimulation with *Porphyromonas gingivalis* via toll-like receptor 2. *Journal of periodontology* 75:370–379.
- Kwaik, Y.; Abu, G.; Lian, Y.; Stone, B.; Venkataraman, C.; Harb, O. (1998): Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Applied and environmental microbiology* 64:3127–3133.



- Lang, H.; Schüler, N.; Arnhold, S.; Nolden, R.; Mertens, T. (1995): Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultured in vitro. *Journal of dental research* 74:1219-1225.
- Lang, H.; Schüler, N.; Nolden, R. (1998): Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects—a study in minipigs. *Journal of dental research* 77:393-405.
- Lamont, R.; Jenkinson, H. (2001): Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology* 15:341-349.
- Lamont, R.; Chan, A.; Belton, C.; Izutsu, K.; Vasel, D.; Weinberg, A. (1995): *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infection and immunity* 63:3878–3885.
- Lamont, R.; Jenkinson, H. (1998): Life below the gum line: Pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and molecular biology reviews* 62:1244–1263.
- Leng, S.; McElhaney, J.; Walston, J.; Xie, D.; Fedarko, N.; Kuchel, G. (2008): ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 63:879–884.
- Liotta, F.; Angeli, R.; Cosmi, L.; Filì, L.; Manuelli, C.; Frosali, F. *et al.* (2008): Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing notch signaling. *Stem cells* 26:279–289.
- Liu, Y.; Zheng, Y.; Ding, G.; Fang, D.; Zhang, C.; Bartold, P. *et al.* (2008): Periodontal Ligament Stem Cell-Mediated Treatment for Periodontitis in Miniature Swine. *Stem cells* 26:1065-1073.
- Loesche, W. (1969): Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Applied microbiology* 18:723–727.
- Mahanonda, R.; Pichyangkul, S. (2007): Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontology* 2000 43:41–55.
- Mangan, D.; Novak, M.; Vora, S.; Mourad, J.; Kriger, P. (1989): Lectinlike interactions of *Fusobacterium nucleatum* with human neutrophils. *Infection and immunity* 57:3601–3611.
- Mazmanian, S.; Cui, H.; Tzianabos, A.; Kasper, D. (2005): An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122:107–118.
- Medzhitov, R.; Janeway Jr, C. (2000): The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in microbiology* 8:452–456.
- Mei, S.; Haitsma, J.; Dos Santos, C.; Deng, Y.; Lai, P.; Slutsky, A. *et al.* (2010): Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182:1047-1057.
- Meisel, R.; Brockers, S.; Heseler, K.; Degistirici, O.; Bülle, H.; Woite, C. *et al.* (2011): Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*:

- official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K*  
25:648–654.
- Melcher, A. (1985): Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 67:130.
- Mercado, F.; Marshall, Roderick I.; Klestov, A.; Bartold, P. (2001): Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Journal of periodontology* 72:779–787.
- Merchant, A.; Oranbandid, S.; Jethwani, M.; Choi, Y.; Morrato, E.; Pitiphat, W. *et al.* (2005): Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *Journal of periodontology* 76:1406–1419.
- Meyer, D.; Mintz, K.; Fives-Taylor, P. (1997): Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 8:389-409.
- Meyer, D.; Lippmann, J.; Fives-Taylor, P. (1996): Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infection and immunity* 64:2988.
- Micheelis, W.; Schiffner, U.; Hoffmann, T. (2006): Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV): Neue Ergebnisse zu oralen Erkrankungsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland. *Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV*.
- Minguell, J.; Erices, A.; Conget, P. (2001): Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine* 226:507-520.
- Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L.W.; Robey, P.; Shi, S. (2003): SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5807–5812.
- Molinari, G.; Talay, S.; Valentin-Weigand, P.; Rohde, M.; Chhatwal, G. (1997): The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infection and immunity* 65:1357–1363.
- Moore, W. Moore, L. (1994): The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5:66-77.
- Morscheck, C.; Götz, W.; Schierholz, J.; Zeilhofer, F.; Kühn, U.; Möhl, C. *et al.* (2005): Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology* 24:155–165.
- Morscheck, C.; Dress, J.; Gosau, M. (2012): Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* but not from *Porphyromonas gingivalis* induce pro-inflammatory cytokines and alkaline phosphatase in dental follicle cells. *Archives of Oral Biology* 57:1595–1601.
- Morscheck, C.; Reichert, T.; Völlner, F.; Gerlach, T.; Driemel, O. (2007): The state of the art in human dental stem cell research [Stand der humanen dentalen Stammzellforschung]. *Mund - Kiefer - und Gesichtschirurgie* 11:259–266.

- Morsczeck, C.; Schmalz, G.; Reichert, T.; Völlner, F.; Galler, K.; Driemel, O. (2008): Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations* 12:113-118.
- Mulvey, M. (2002): Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 4: 257–271.
- Müller, A.; Heseler, K.; Schmidt, S.; Spekker, K.; MacKenzie, C.; Däubener, W. (2009): The missing link between indoleamine 2, 3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *Journal of cellular and molecular medicine* 13:1125–1135.
- Nakayama, K. (1994): Rapid viability loss on exposure to air in a superoxide dismutase-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of bacteriology* 176:1939–1943.
- Németh, K.; Leelahavanichkul, A.; Yuen, P.S.T; Mayer, B.; Parmelee, A.; Doi, K. *et al.* (2008): Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* 15:42–49.
- Neuß-Stein, S. (2004): Untersuchungen zur Bedeutung mesenchymaler Stammzellen in der Geweberegeneration. Bibliothek der RWTH Aachen.
- Nobbs, A.; Lamont, R.; Jenkinson, H. (2009): Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and molecular biology reviews* 73: 407.
- Offenbacher, S. (1996): Periodontal diseases: pathogenesis. *Annals of periodontology* 1: 821–878.
- Offenbacher, S.; Katz, V.; Fertik, G.; Collins, J.; Boyd, D.; Maynor, G. *et al.* (1996): Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of periodontology* 67:1103–1113.
- Okada, H.; Murakami, S. (1998): Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 9:248-266.
- Page, R. (1991): The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *Journal of Periodontal Research* 26:230–242.
- Page, R.; Beck, J. (1997): Risk assessment for periodontal diseases\*. *International Dental Journal* 47:61-87.
- Peyret-Lacombe, A.; Brunel, G.; Watts, M.; Charveron, M.; Duplan, H. (2009): TLR2 sensing of *F. nucleatum* and *S. sanguinis* distinctly triggered gingival innate response. *Cytokine* 46:201–210.
- Pathirana, R.; O'Brien-Simpson, N.; Reynolds, E. (2010). Host immune responses to *Porphyromonas gingivalis* antigens. *Periodontology 2000* 52:218–237.
- Phinney, D.; Prockop, D. (2007): Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem cells* 25:2896-2902.
- Pittenger, M.; Mackay, A.; Beck, S.; Jaiswal, R.; Douglas, R.; Mosca, J. *et al.* (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147.

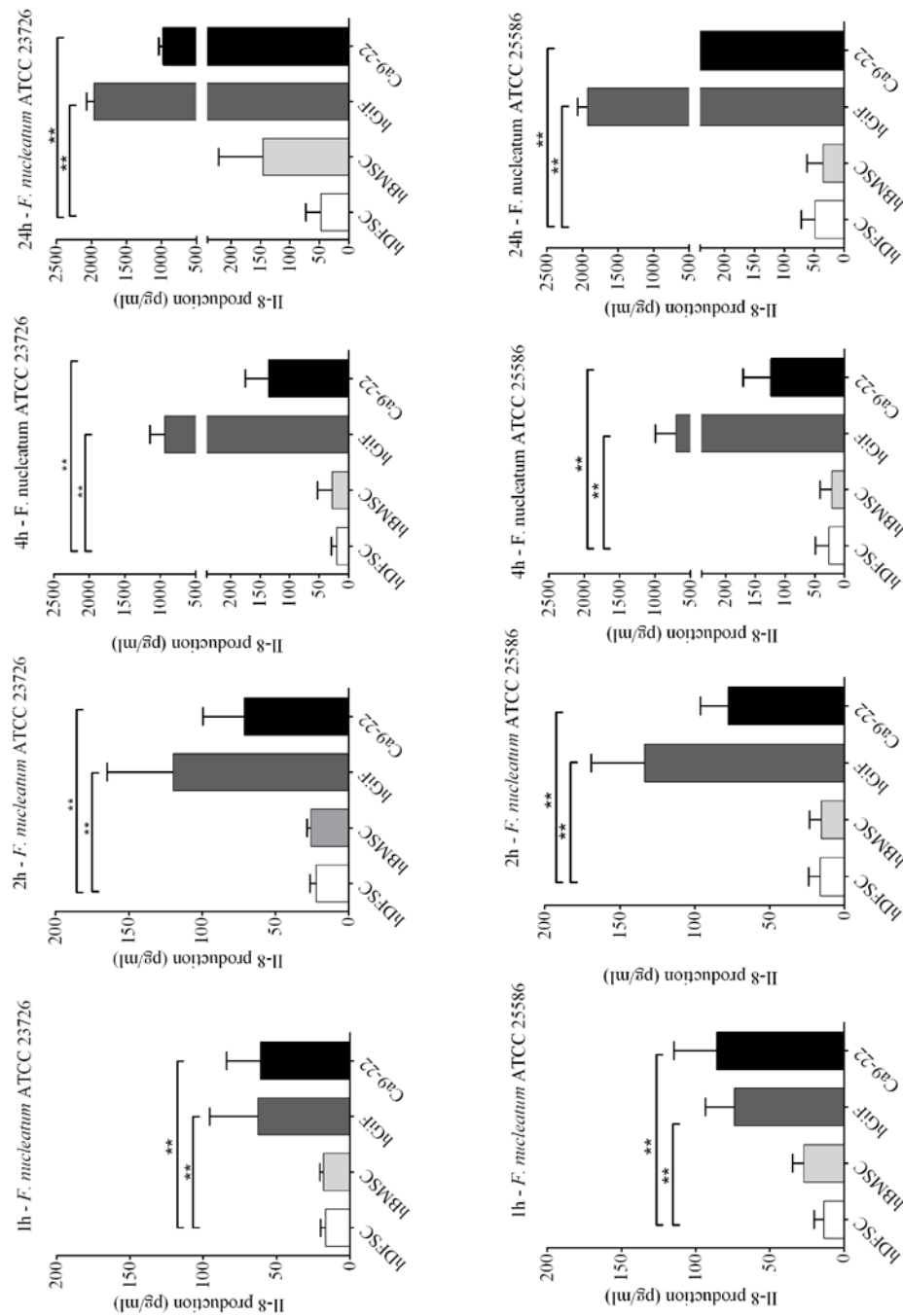
- Preshaw, P.; Taylor, J. (2011): How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of Clinical Periodontology* 38:60–84.
- Prockop, D.; Oh, J. (2011): Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Molecular Therapy* 20:14-20.
- Radlanski, R. (2011): Orale Struktur-und Entwicklungsbiologie: Quintessenz-Verlag.
- Ringe, J.; Kaps, C.; Burmester, G.; Sittering, M. (2002): Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 89:338–351.
- Rosan, B.; Lamont, R. (2000): Dental plaque formation. *Microbes and Infection* 2:1599–1607.
- Saito, A. Inagaki, S.; Kimizuka, R.; Okuda, K.; Hosaka, Y.; Nakagawa, T.; Ishihara, K. (2008): Fusobacterium nucleatum enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 54:349–355.
- Saito, A.; Kokubu, E.; Inagaki, S.; Imamura, K.; Kita, D.; Lamont, R.; Ishihara, K. (2012): Porphyromonas gingivalis entry into gingival epithelial cells modulated by Fusobacterium nucleatum is dependent on lipid rafts. *Microbial pathogenesis* 53:234–242
- Saito, A.; Inagaki, S.; Ishihara, K. (2009): Differential ability of periodontopathic bacteria to modulate invasion of human gingival epithelial cells by Porphyromonas gingivalis. *Microbial pathogenesis* 47:329-333.
- Sandros, J.; Karlsson, C.; Lappin, D.; Madianos, P.; Kinane, D.; Papapanou, P. (2000): Cytokine responses of oral epithelial cells to Porphyromonas gingivalis infection. *Journal of dental research* 79:1808–1814.
- Sandros, J.; Papapanou, P. N.; Nannmark, U.; Dahlen, G. (1994): Porphyromonas gingivalis invades human pocket epithelium in vitro. *Journal of Periodontal Research* 29:62–69.
- Seo, B.; Miura, M.; Gronthos, S.; Bartold, P.M; Batouli, S.; Brahimi, J. et al. (2004): Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364:149–155.
- Shanitzki, B.; Hurwitz, D.; Smorodinsky, N.; Ganeshkumar, N.; Weiss, E.I (1997): Identification of a Fusobacterium nucleatum PK1594 galactose-binding adhesin which mediates coaggregation with periopathogenic bacteria and hemagglutination. *Infection and immunity* 65:5231-5237.
- Shapira, L.; Takashiba, S.; Amar, S.; van Dyke, T. (1994): Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide stimulation of human monocytes: Dependence on serum and CD14 receptor. *Oral microbiology and immunology* 9:112–117.
- Shimada, T.; Sugano, N.; Nishihara, R.; Suzuki, K.; Tanaka, H.; Ito, K. (2008): Differential effects of five Aggregatibacter actinomycetemcomitans strains on gingival epithelial cells. *Oral microbiology and immunology* 23:455–458.
- Simmons, P.; Torok-Storb, B. (1991): Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78:55–62.

- Socransky, S.; Haffajee, A. (2002): Dental biofilms: Difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 28:12–55.
- Sonoyama, W.; Liu, Y.; Yamaza, T.; Tuan, R.; Wang, S.; Shi, S.; Huang, G. (2008): Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics* 34:166–171.
- Stathopoulou, P.; Benakanakere, M.; Galicia, J.; Kinane, D. (2010): Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *Journal of Clinical Periodontology* 37:24–29.
- Straube, E.; Schmidt, G.; Marre, R.; Hacker, J. (1993): Adhesion and internalization of *E. coli* strains expressing various pathogenicity determinants. *Zentralblatt für Bakteriologie* 278:218–228.
- Sugawara, S.; Sugiyama, A.; Nemoto, E.; Rikiishi, H.; Takada, H. (1998): Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 66:3043–3049.
- Tabeta, K.; Yamazaki, K.; Akashi, S.; Miyake, K.; Kumada, H.; Umemoto, T.; Yoshie, H. (2000): Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. *Infection and immunity* 68:3731.
- Takada, H.; Ogawa, T.; Yoshimura, F.; Otsuka, K.; Koikeguchi, S.; Kato, K. *et al.* (1988): Immunobiological activities of a porin fraction isolated from *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953. *Infection and immunity* 56:855–863.
- Tally, F.; Stewart, P.; Sutter, V.; Rosenblatt, J. (1975): Oxygen tolerance of fresh clinical anaerobic bacteria. In: *Journal of clinical microbiology* 1:161–164.
- Tamai, R.; Sugamata, M.; Kiyoura, Y. (2011): *Candida albicans* enhances invasion of human gingival epithelial cells and gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis*. *Microbial pathogenesis* 51:250–254.
- Tamai, R.; Sakuta, T.; Matsushita, K.; Torii, M.; Takeuchi, O.; Akira, S. *et al.* (2002): Human gingival CD14+ fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14 and MyD88 mRNA expression. *Infection and immunity* 70:1272–1278.
- Tanner, A.; Bouldin, H. (1989): The microbiota of early periodontitis lesions in adults. *Journal of Clinical Periodontology* 16:467–471.
- Tan, Z.; Nagaraja, T.; Chengappa, M. (1996): *Fusobacterium necrophorum* infections: virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Veterinary research communications* 20:113–140.
- Tomic, S.; Djokic, J.; Vasilijic, S.; Vucevic, D.; Todorovic, V.; Supic, G.; Colic, M. (2011): Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells and Development* 20:695–708.

- Tuttle, R.; Strubel, N.; Mourad, J.; Mangan, D. (1992): A non-lectin-like mechanism by which *Fusobacterium nucleatum* 10953 adheres to and activates human lymphocytes. *Oral microbiology and immunology* 7:78-83.
- Verfaillie, C. (2002): Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency. *Trends in cell biology* 12:502–508.
- Verfaillie, C.; Schwartz, R.; Reyes, M.; Jiang, Y. (2003): Unexpected potential of adult stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 996: 231–234.
- Wada, N.; Gronthos, S.; Bartold, P.M (2013): Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontology* 2000 63:198–216.
- Wada, N.; Menicanin, D.; Shi, S.; Bartold, P.; Gronthos, S. (2009): Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal of cellular physiology* 219:667-676.
- Wang, S.; Liu, Y; Fang, D.; Shi, S. (2007): The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research. *Oral diseases* 13:530–537.
- Wara-Aswapati, N.; Chayasadam, A.; Surarit, R.; Pitiphat, W.; Boch, J.; Nagasawa, T. *et al.* (2013): Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of periodontology* 84:1010–1018.
- Wada, N.; Gronthos, S.; Bartold, P.M (2013): Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontology* 2000 63:198–216.
- Wada, N.; Menicanin, D.; Shi, S.; Bartold, P.; Gronthos, S. (2009): Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *Journal of cellular physiology* 219: 667-676.
- Watanabe, K.; Yamaji, Y.; Umemoto, T. (1992): Correlation between cell-adherent activity and surface structure in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral microbiology and immunology* 7:357–363.
- Weiss, E.; Shanitzki, B.; Dotan, M.; Ganeshkumar, N.; Kolenbrander, P.; Metzger, Z. (2000): Attachment of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin. *Oral microbiology and immunology* 15:371–377.
- Wilson, M.; Seymour, R.; Henderson, B. (1998): Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infection and immunity* 66:2401–2409.
- Winkler, J.; John, S.; Kramer, R.; Hoover, C.; Murray, P. (1987): Attachment of oral bacteria to a basement-membrane-like matrix and to purified matrix proteins. *Infection and immunity* 55:2721–2726.
- Wolf, H.; Rateitschak, K. (2003): *Farbatlant der Zahnmedizin 1: Parodontologie*: Georg Thieme Verlag.
- Ximénez-Fyvie, L.; Haffajee, A.; Socransky, S. (2000): Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology* 27:722-732.

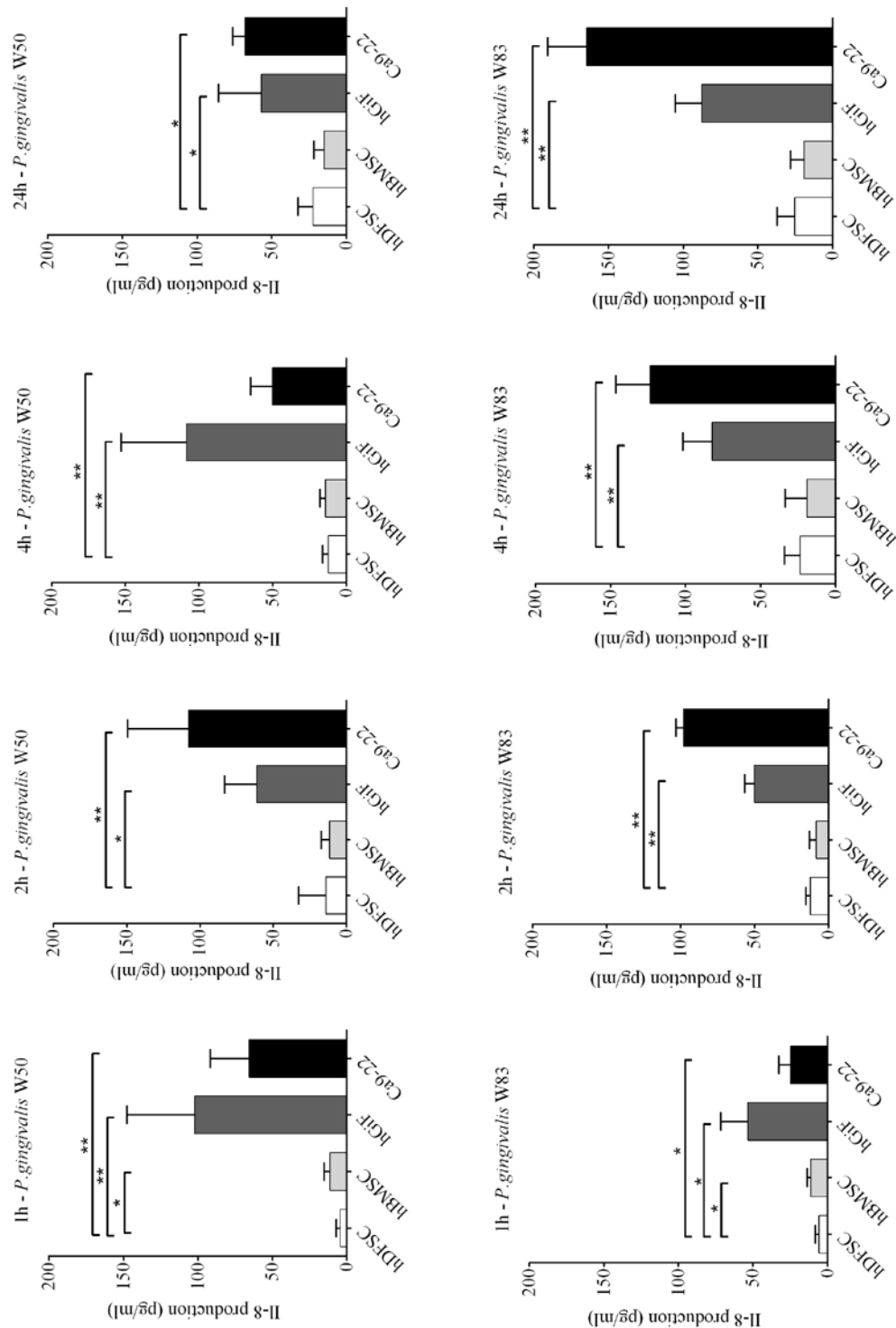
- Yamanaka, S.; Blau, H. (2010): Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704–712.
- Yamashita, Y.; Jones, D.; Fuller, M. (2003): Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* 301:1547–1550.
- Yoshida, S.; Ito, D.; Nagumo, T.; Shiota, T.; Hatori, M.; Shintani, S. (2009): Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G<sub>1</sub> phase cell cycle arrest. *Oral oncology* 45:109–115.
- Zhang, J.; Dong, H.; Kashket, S.; Duncan, M. (1999): IL-8 degradation by Porphyromonas gingivalis proteases. *Microbial pathogenesis* 26:275–280.
- Zhang, Q.; Shi, S.; Liu, Y.; Uyanne, J.; Shi, Y.; Le, A. (2009): Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology* 183:7787–7798.
- Zhang, J.; Zhang, Y.; Lv, H.; Yu, Q.; Zhou, Z.; Zhu, Q. *et al.* (2013): Human Stem Cells from the Apical Papilla Response to Bacterial Lipopolysaccharide Exposure and Anti-inflammatory Effects of Nuclear Factor IC. *Journal of Endodontics* 39:1416–1422.
- Zilm, P.; Rogers, A. (2007): Co-adhesion and biofilm formation by Fusobacterium nucleatum in response to growth pH. *Anaerobe* 13:146-152.

## Anhang



**Abb. A 1. Vergleichende Übersichtsdarstellung der IL-8-Werte aller Zellen in Ko-Kultur mit *F. nucleatum*:** Graphisch dargestellt sind die im ELISA-Assay ermittelten Zytokinmengen in pg/ml aus den Überständen der Ko-Kulturen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 24 h Ko-Inkubation. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (T-Test). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.





**Abb. A 2. Vergleichende Übersichtsdarstellung der IL-8-Werte aller Zellen in Ko-Kultur mit *F. nucleatum*:** Graphisch dargestellt sind die im ELISA-Assay ermittelten Zytokinmengen in pg/ml aus den Überständen der Ko-Kulturen nach 1 h, 2 h, 4 h, und 24 h Ko-Inkubation. Mit Sternchen markierte Werte heben statistisch signifikante Unterschiede zwischen hDFSC gegenüber hBMSC, hGiF und Ca9-22 zu dem äquivalenten Zeitpunkt hervor, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (T-Test). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1.1: Anatomische Grundlagen des Parodonts.....  | 1  |
| Abb. 1.2: Parodontitis.....  | 2  |
| Abb. 1.3: Link - Aggressive Parodontitis marginalis bei einer 40-jährigen Patientin                |    |
| Rechts- Röntgenologische Darstellung des parodontitisbedingten Knochenabbaus                       | 3  |
| Abb. 3.1: Lichtmikroskopische Aufnahme A) hDFSC 7 Tage nach Aussaat.                               |    |
| B) hDFSC-Kultur nach 21 Tagen.....   | 29 |
| Abb. 3.2: Ausgewählte FACS-Histogramme: Oberflächenantigene .....                                  | 30 |
| Abb. 3.3: Wachstumskinetik: <i>P. gingivalis</i> und <i>F. nucleatum</i> in DMEM-Zellkulturmedium. | 31 |
| Abb.3.4: Überlebensraten von hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22 unter anaeroben                         |    |
| Bedingungen.....   | 32 |
| Abb. 3.5: Adhärenz .....   | 35 |
| Abb. 3.6: Internalisierung.....  | 37 |
| Abb.3.7:Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von humanen Stammzellen.....                           | 38 |
| Abb.3.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur hDFSC mit <i>F. nucleatum</i> .....       | 38 |
| Abb. 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur hDFSC mit <i>P. gingivalis</i> .....     | 39 |
| Abb. 3.10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur hBMSC mit <i>F. nucleatum</i> ...       | 39 |
| Abb. 3.11: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Ko-Kultur hDFSC mit <i>P. gingivalis</i> ....     | 40 |
| Abb. 3.12: Rasterelektronenmikroskopische Analyse: Adhärenz <i>F. nucleatum</i> /hDFSC.....        | 41 |
| Abb. 3.13: Rasterelektronenmikroskopische Analyse: Adhärenz <i>P. gingivalis</i> /hDFSC. ....      | 41 |
| Abb.3.14: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22 nach Ko-Kultur mit                      |    |
| <i>F. nucleatum</i> ATTC 23726.. .....   | 43 |
| Abb. 3.15: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen nach Ko-Kultur mit              |    |
| <i>F. nucleatum</i> ATTC 25586.. .....   | 44 |
| Abb. 3.16: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen nach Ko-Kultur mit              |    |
| <i>P. gingivalis</i> W50.....  | 45 |
| Abb. 3.17: IL-8-Sekretion der hDFSC, hBMSC, hGiF und Ca9-22-Zellen nach Ko-Kultur mit              |    |
| <i>P. gingivalis</i> W83.....  | 46 |

**Tabellenverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 2.1 Übersicht der Farbstoffe und Antikörper für FACS-Analyse .....        | 17 |
| Tabelle 2.2: Übersicht verwendeter Bakterienstämme.....                           | 18 |
| Tabelle 2.3 Lösungen und Medium für die Bakterien-Kultur.....                     | 18 |
| Tabelle 2.4: Lösungen für den IL-8-ELISA-Test.....                                | 23 |
| Tabelle 2.5: Übersicht verwendeter Chemikalien/Enzyme/Antibiotika .....           | 24 |
| Tabelle 2.6: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien .....                    | 26 |
| Tabelle 2.7: Puffer.....  | 27 |
| Tabelle 2.8: Übersicht verwendeter Software .....                                 | 27 |
| Tabelle 2.9: Übersicht verwendeter Laborgeräte .....                              | 28 |
| Tabelle 3.1 Adhärenz- und Internalisierungswerte .....                            | 34 |
| Tabelle 3.2 IL-8-Sekretion von hDFSC im Vergleich zu hBMSC, hGiF und Ca9-22 ..... | 42 |

**Abkürzungsverzeichnis**

|                          |   |
|--------------------------|---|
| A. actinomycetemcomitans | Aggregatibacter actinomycetemcomitans                     |
| Abb.                     | Abbildung   |
| Aqua dest.               | Reinstwasser  |
| ATCC                     | American Type Culture Collection                          |
| BSA                      | Bovines Serumalbumin                                      |
| Ca9-22                   | Karzinomzelllinie der oralen Epithelzellschicht           |
| CD                       | Cluster of differentiation                                |
| CFU                      | Colony-forming units                                      |
| DMEM                     | Dulbecco`s Modified Eagle Medium                          |
| DMSO                     | Dimethylsulfoxid  |
| DSMZ                     | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen    |
| EDTA                     | Ethylendiamintetraacetat                                  |
| ELISA                    | Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay                        |
| EMZ                      | Elektronenmikroskopiezentrum                              |
| F. nucleatum             | Fusobacterium nucleatum                                   |
| FACS                     | Fluorescence-activated cell sorting/ Durchflusszytometrie |
| FKS                      | Fetales Kälberserum                                       |
| G                        | Erdbeschleunigung   |
| H                        | Stunde  |
| hBMSC                    | Humane mesenchymale Knochenmarksstammzellen               |
| hDFSC                    | Humane dentale Follikel-Stammzellen                       |
| hDPSC                    | Humane dentale Pulpa-Stammzellen                          |
| hSCAP                    | Humane Stammzellen der apikalen Papille                   |
| IDO                      | Indoleamine-2,3-Dioxygenase                               |
| IL                       | Interleukin   |
| ISCT                     | International Society for Cellular Therapy                |
| KBE                      | Kolonie-bildende Einheiten                                |
| KB-Zellen                | Immortalisierte orale Epidermoidkarzinom-Zelllinie        |
| LL-37/ hCAP              | Cathelicidin Antimicrobial Peptide                        |
| LPS                      | Lipopolysaccharid   |
| M                        | Molare Masse  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| MSC                  | Mesenchymale Stammzelle                    |
| MSCGM                | Mesenchymal Stem Cell Growth Medium        |
| Nm                   | Nanometer                                  |
| OD495                | Optische Dichte bei 495 nm                 |
| OD600                | Optische Dichte bei 600 nm                 |
| <i>P. gingivalis</i> | <i>Porphyromonas gingivalis</i>            |
| PAMP                 | Pathogen-Associated-Molecular-Pattern      |
| PBS                  | Phosphatgepufferte Salzlösung              |
| PGE2                 | Prostaglandin E2                           |
| pH                   | Potentia hydrogenium (lat.)                |
| PI                   | Propidium-Iodid                            |
| PMNs                 | Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten. |
| PRR                  | Pattern Recognition Receptor               |
| PYG-Medium           | Peptone-Yeast-Glucose-Medium               |
| REM                  | Rasterelektronenmikroskopie                |
| Rpm                  | Umdrehungen pro Minute                     |
| TLR                  | Toll-Like-Rezeptor                         |
| TNF                  | Tumornekrosefaktor                         |
| U/ml                 | Einheiten pro Milliliter                   |

## **Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 22.01.2015

Anne Biedermann